

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

MARCELO DUZZIONI

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E ELETROGRÁFICOS DA
ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE UFP-101, UM
ANTAGONISTA PEPTÍDICO NOP, EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima.

Coorientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Gavioli.

Florianópolis, 25 de março de 2011.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

D988e Duzzioni, Marcelo

Efeitos comportamentais e eletrográficos da administração central de UFP-101, um antagonista peptídico NOP, em ratos [tese] / Marcelo Duzzioni ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima. - Florianópolis, SC, 2011.

123 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Neuropeptídeos. 4. Nociceptina. I. Lima, Thereza Christina Monteiro de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Efeitos comportamentais e eletrográficos da administração central de UFP-101, um antagonista peptídico NOP, em ratos

MARCELO DUZZIONI

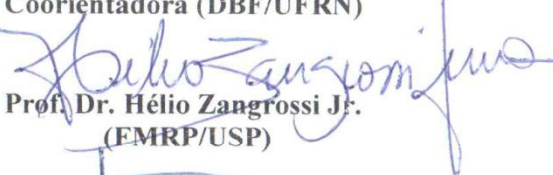
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



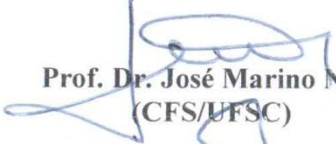
Profa. Dra. Thereza Christina M. De Lima
Presidente (FMC/UFSC)



Profa. Dra. Elaine Cristina Gavioli
Coorientadora (DBF/UFRN)



Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.
(EMRP/USP)



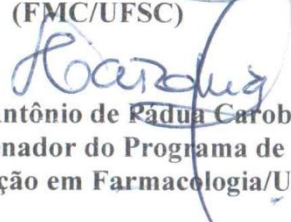
Prof. Dr. José Marino Neto
(CFS/UFSC)



Prof. Dr. Giles Alexander Rae
(FMC-UFSC)



Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
(FMC/UFSC)



Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 25 de Março de 2011.

Dedicatória

*Aos meus queridos pais Nilton Duzzioni e Sirlei Inácio Duzzioni que
sempre me apoiaram e incentivaram.*

*À minha esposa Janaína pelo apoio incondicional, incentivo e
paciência. Te amo!*

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima**, primeiramente, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa ainda como aluno de iniciação científica, depois como aluno de mestrado e agora de doutorado. Durante todo esse tempo seus valiosos ensinamentos, sua experiência, seu apoio, incentivo, paciência, seus valores e visão crítica dos fatos marcaram fortemente minha formação científica. Muito obrigado!

À professora e coorientadora **Dra. Elaine Cristina Gavioli** pela orientação, apoio incondicional, incentivo, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos sobre o sistema N/OFQ-receptor NOP ao longo desses anos.

Aos professores membros da banca examinadora **Dra. Aurea Elizabeth Linder**, **Dr. Giles Alexander Rae**, **Dr. Hélio Zangrossi Jr**, **Dr. José Marino Neto** e **Dr. Reinaldo N. Takahashi**, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram para a elaboração da versão final desta Tese.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, em especial aos professores **Dr. Reinaldo N. Takahashi** e **Dr. Carlos Rogério Tonussi** pelos ensinamentos, profissionalismo e atenção em todas as horas.

Ao professor **Dr. Juan Antonio Micó Segura** e ao Grupo de Investigação e Desenvolvimento em Neuropsicofarmacologia da Universidad de Cádiz, Espanha, pelo acolhimento durante minha permanência em Cádiz, durante o doutorado *sandwich*, pela orientação e pelas sugestões, críticas e comentários fundamentais para a realização de parte deste trabalho. À professora **Dra. Esther M. Berrocoso Domínguez** pela orientação, ensinamentos, paciência e disponibilidade em discutir os resultados dos registros da atividade elétrica do *locus coeruleus*. Ao professor **Dr. Juan Gibert Rahola** pela atenção. *Las niñas Blanca Lorena Cobo Realpe, Lúdia Bravo García, Raquel Rey Brea, María Del Carmem Romero Grimaldi, Clara Muños Mediavilla, Laura Pérez Caballero, Meritxell Llorca Torralva, Patricia Miranda, Loli López Santiago, Maru* e, em especial, **Cristina Alba Delgado** e **Sonia Torres Sánchez** por gentilmente me ensinarem a técnica de registro da atividade elétrica do *locus coeruleus*. *El niño Jesús Gallego Gamo. Muchas gracias!*

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, **Diana, Murilo, Pedro, Rita** e **Zu**, pelo carinho e atendimento aos mais variados pedidos.

Aos colegas de laboratório, **Ana Valquíria Calixto, Ana Paula Ramos Costa, Andressa Gazola, Bianca Romanó de Corte, Carize Fagundes, Claudini Honório de Pieri, Evelyn Cristina Silva Santos, Gilliard Lach, Ismael Nunes, Leandro Rinaldi Leme, Nayana Moreira Silva, Rebeca Santos Marques de Carvalho e Saulo de Paiva Schmidt** pelos conhecimentos trocados, pela convivência e acima de tudo, por terem feito do laboratório uma extensão da minha casa, principalmente pelos bolos.

Aos amigos e parceiros de trabalho **Alexandre Ademar Hoeller e Filipe Silveira Duarte**, pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amizade ao longo desses anos.

À minha família, em especial aos meus pais: **Nilton Duzzioni e Sirlei Inácio Duzzioni**, pelo amor, carinho e por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos **Rodrigo, Daniela, Eduardo, Fernando e Renata** e aos seus respectivos cônjuges pelo carinho, apoio, amizade e por se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida.

Às minhas sobrinhas **Ana Carolina, Isadora e Maria Eduarda**, e aos meus sobrinhos **Caio e Marco Antônio**, pela beleza, simplicidade e pureza.

À minha esposa, **Janaína Accordi Junkes**, pelo amor, carinho, incentivo e dedicação e, em especial, pela compreensão ao longo desses anos. Muito obrigado!

À **CAPES** e ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas não mencionadas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“O acaso encontra sempre quem saiba aproveitar-se dele.”
Romain Rolland

RESUMO

Atualmente, drogas com atividade antidepressiva, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, são os fármacos de primeira escolha no tratamento de um amplo espectro dos transtornos de ansiedade. Resultados pré-clínicos demonstraram que o tratamento agudo ou crônico com [Nphe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-101), antagonista peptídico competitivo do receptor NOP para nociceptina, apresentou um efeito do tipo antidepressivo. Entretanto, existem poucas evidências sobre os efeitos do bloqueio dos receptores NOP com UFP-101 nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade. Assim, este trabalho teve como objetivo inicial avaliar os efeitos da administração central de UFP-101 no comportamento de ratos avaliados no labirinto em T elevado (LTE). O LTE é um modelo animal que permite a medida simultânea de dois comportamentos defensivos – a esquia inibitória e a fuga, que estão relacionadas com o transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de pânico, respectivamente. A administração no ventrículo lateral de UFP-101 (1 e 3 nmol) promoveu, via receptor NOP, um efeito do tipo ansiolítico, pois o pré-tratamento com N/OFQ (3 nmol), agonista NOP, preveniu a redução da latência de esquia inibitória promovida pelo UFP-101. A latência de fuga e a atividade locomotora avaliada no campo aberto (CA) não foram alteradas por nenhum tratamento. O tratamento prévio com os inibidores de peptidase, bestatina (2 nmol) e fosforamidon (2 pmol) sugeriu que o efeito comportamental produzido pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 (1 nmol) no LTE parece ser proveniente de um fragmento C-terminal produto da degradação enzimática do peptídeo, pois a bestatina, um inibidor de aminopeptidase-N, impediu esse efeito. Já o tratamento prévio com fosforamidon e a interação bestatina+fosforamidon não alterou o efeito do UFP-101 no LTE. Além disso, a latência de fuga no LTE e a atividade locomotora no CA não foram alteradas por nenhum tratamento. A inibição da síntese de serotonina com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg, I.P., 4 dias) preveniu o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 (1 nmol) no LTE, indicando a participação do sistema serotoninérgico neste efeito. A administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 pmol) no núcleo dorsal da rafe reduziu a latência de esquia inibitória no LTE. Novamente, a latência de fuga no LTE e a atividade locomotora no CA não foram alteradas. No teste de esconder esferas (TEE), a administração central de UFP-101 (0,3, 1 e 3 nmol) reduziu significativamente o número de esferas escondidas, indicando um efeito do tipo ansiolítico. Este efeito foi

resistente ao bloqueio por naloxona (1 mg/Kg, I.P., sem efeito *per se*), um antagonista não seletivo de receptores opióides, não preveniu este efeito no TEE. Entretanto, as doses de 1 e 3 nmol de UFP-101 prejudicaram a atividade locomotora no CA. A participação dos neurônios noradrenérgicos do loco cerúleo (LC) no efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 foi investigada através do registro dos potenciais de ação. A redução na taxa de disparo dos neurônios do LC promovida pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 (0,3 e 1 nmol) foi prevenida com a administração endovenosa de naloxona (1 mg/Kg, sem efeito *per se*), indicando que esse efeito ocorre via receptores opióides e que a modulação da atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC não parece ser um dos mecanismos responsáveis pelo efeito do tipo ansiolítico do UFP-101. Em resumo, o efeito do tipo ansiolítico observado no LTE após a administração central de UFP-101 parece ser proveniente de um fragmento C-terminal da degradação enzimática do peptídeo e ocorre via receptor NOP, sendo que o sistema serotoninérgico, mas não o noradrenérgico, parece exercer um papel modulatório essencial nesse efeito.

ABSTRACT

Currently, drugs with antidepressant activity, *e.g.*, selective serotonin reuptake inhibitors, are the first choice as pharmacological treatment for a wide spectrum of anxiety disorders. Preclinical results showed that acute or chronic treatment with the NOP antagonist [Nphe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-101) produced antidepressant-like effects. However, there are few studies regarding the effects of blockade of NOP receptor with UFP-101 in fear- and anxiety- related behaviors. Thus, the aim of the present study was to verify the effects of the central administration of UFP-101 in the behavior of rats evaluated in the elevated T maze (ETM). The ETM is an animal paradigm that allows the measurement of two behavioral defensive responses which have been associated with generalized anxiety (inhibitory avoidance) and panic (escape) disorder. Our results showed that the administration of UFP-101 (1 and 3 nmol) into the lateral ventricle promotes, via central NOP receptors, an anxiolytic-like effect, since pretreatment with natural NOP agonist N/OFQ (3 nmol) fully prevented the reduction in inhibitory avoidance latency promoted by UFP-101. The latency to escape and locomotor activity in open field test (OF) were not changed by any treatment. The influence of pretreatment with the peptidase inhibitors bestatin (2 nmol) and phosphoramidon (2 pmol) in this effect was evaluated and our results showed that the behavioral effects of the UFP-101 (1 nmol) in the ETM could be due to a C-terminal fragment of enzymatic degradation of peptide, since bestatin, an aminopeptidase-N inhibitor, prevented this effect. Pretreatment with phosphoramidon and the interaction bestatin+phosphoramidon did not prevent the effect of UFP-101. The latency to escape in the ETM as well as locomotor activity in the OF were not altered by any treatment. Inhibition of serotonin synthesis by 4-chloro-DL-phenylalanine (PCPA, 100mg/kg, I.P., 4 days) prevented the anxiolytic-like effect of UFP-101 in the ETM indicating the involvement of the serotonergic system in this effect. The participation of neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) was assessed by intra-DRN administration of UFP-101 (1, 3 or 10 pmol) which reduced the inhibitory avoidance latency in the ETM. Again, the latency to escape in the ETM as well as locomotor activity in the OF were not altered. The effects of central administration of UFP-101 (0.1, 0.3, 1 and 3 nmol) in the marble-burying test (MBT) showed a reduction in the number of marbles buried, indicating an anxiolytic-like effect. However, the doses of 1 and 3 nmol of UFP-101 reduced the locomotor

activity in OF. Pretreatment with naloxone (1 mg/kg, I.P., without any effect *per se*) did not prevent the anxiolytic-like effect of UFP-101 (1 nmol) in MBT. The participation of noradrenergic neurons from the *locus coeruleus* (LC) in the anxiolytic-like effect of UFP-101 was assessed through the recording of action potentials that were reduced by UFP-101 (0.3 and 1 nmol). This effect was prevented by intravenous administration of naloxone (1 mg/kg, without any effect *per se*), suggesting that this effect occurs via opioid receptors and that the modulation of electrical activity of LC noradrenergic neurons cannot be attributed as the underlying mechanisms for the anxiolytic-like effect of UFP-101. In conclusion, the anxiolytic-like effect found after the central administration of UFP-101, as evaluated in ETM, appears to be due to a C-terminal fragment of the enzymatic degradation of peptide and occurs via receptor NOP, being modulated by the serotonergic system, but not the noradrenergic one.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da N/OFQ e do UFP-101	13
Figura 2 – Sistema de registro da atividade elétrica extracelular de um único neurônio do loco cerúleo (LC).....	28
Figura 3 – Labirinto em T elevado (LTE).....	30
Figura 4 – Campo aberto (CA) para avaliar a atividade locomotora espontânea de ratos Wistar.....	31
Figura 5 – Sistema de monitoramento da atividade locomotora espontânea de ratos Sprague-Dawley	32
Figura 6 – Teste de esconder esferas (TEE).....	33
Figura 7 – Delineamento do Experimento 1	33
Figura 8 – Delineamento do Experimento 2	34
Figura 9 – Delineamento do Experimento 3	35
Figura 10 – Delineamento do Experimento 4.....	36
Figura 11 – Delineamento do Experimento 5.....	37
Figura 12 – Delineamento do Experimento 6.....	38
Figura 13 – Delineamento do Experimento 7.....	40
Figura 14 – Delineamento do Experimento 8.....	41
Figura 15 – Delineamento do Experimento 9.....	42
Figura 16 – Delineamento do Experimento 10.....	43
Figura 17 – Delineamento do Experimento 11.....	44
Figura 18 – Delineamento do Experimento 12.....	45
Figura 19 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) no labirinto em T elevado	49
Figura 20 – Efeito da administração de N/OFQ (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado.....	51
Figura 21 – Influência do pré-tratamento com N/OFQ (0,3 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado	53
Figura 22 – Influência do pré-tratamento com bestatina (2 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral nas latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado	55
Figura 23 – Influência do pré-tratamento com fosforamidon (2 pmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado.....	57

Figura 24 – Influência do pré-tratamento com fosforamidon (2 pmol) e bestatina (2 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado	59
Figura 25 – Influência do pré-tratamento com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg, I.P., 4 dias) no efeito da administração no ventrículo lateral de UFP-101 (1 nmol) nas latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado	61
Figura 26 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 pmol) no núcleo dorsal da rafe sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado	63
Figura 27 – Efeito da administração de UFP-101 (0,1, 0,3, 1 ou 3 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas	65
Figura 28 – Efeito da administração de UFP-101 0,3 nmol no ventrículo lateral sobre a pressão arterial (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) <i>in vivo</i>	66
Figura 29 – Efeito da administração de UFP-101 0,3 e 1 nmol no ventrículo lateral sobre a pressão arterial (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) <i>in vivo</i>	66
Figura 30 – Influência do pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg, I.P.) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas	67
Figura 31 – Influência do pré-tratamento endovenoso com naloxona (1 mg/Kg) no efeito da administração de UFP-101 (0,3 e 1 nmol) no ventrículo lateral sobre a pressão arterial (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) <i>in vivo</i>	68
Figura 32 – Modificações na sequência de aminoácidos do peptídeo endógeno N/OFQ que levaram a síntese do UFP-101	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O papel dos neuropeptídeos e de seus receptores em diferentes testes de ansiedade.....	7
Tabela 2 – Efeitos <i>in vivo</i> do UFP-101 e as interações com a N/OFQ. 14	
Tabela 3 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de cruzamentos e de comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto	50
Tabela 4 – Efeito da administração de N/OFQ (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	52
Tabela 5 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	54
Tabela 6 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	56
Tabela 7 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	58
Tabela 8 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	60
Tabela 9 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto.....	62
Tabela 10 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 pmol) no núcleo dorsal da rafe sobre o número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto	64
Tabela 11 – Efeito da administração de UFP-101 (0,1, 0,3, 1 ou 3 nmol) no ventrículo lateral sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto.....	65
Tabela 12 – Distância total percorrida no teste do campo aberto.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

CA – campo aberto

E.P.M. – erro padrão da média

I.P. – intraperitoneal

ISRS – inibidor seletivo da recaptação de serotonina

ISRSN – inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina

LC – loco cerúleo

LCE – labirinto em cruz elevado

LTE – labirinto em T elevado

min – minuto(s)

NDR – núcleo dorsal da rafe

N/OFQ – nociceptina/orfanina FQ

NOP^{-/-} – *knockout* para o receptor NOP

s – segundo(s)

SCPD – substância cinzenta periaquedutal dorsal

TEE – teste de esconder esferas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ansiedade	1
1.1.1. Tratamentos Farmacológicos dos Transtornos de Ansiedade	3
1.1.2. Novos Tratamentos dos Transtornos de Ansiedade	4
1.2. Neuropeptídeos e Ansiedade	5
1.2.1. Nociceptina/orfanina FQ e o receptor NOP	10
1.2.2. Nociceptina/orfanina FQ e ansiedade	11
1.2.3. UFP-101	12
1.3. Labirinto em T elevado - modelo experimental de ansiedade	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais	23
3.2. Drogas e soluções	24
3.3. Cirurgias estereotáxicas	25
3.3.1. Implante de cânula-guia para administração de drogas no ventrículo lateral ou no NDR de ratos Wistar	25
3.3.2. Implante de cânula-guia para administração de drogas no ventrículo lateral e de um eletrodo para registrar <i>in vivo</i> a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley	26
3.4. Eletrodo de registro	27
3.5. Sistema de registro da atividade elétrica dos neurônios do LC	27
3.6. Localização e identificação dos neurônios do LC	28
3.7. Microinjeção intracerebral	29
3.8. Testes Comportamentais	29
3.8.1. Labirinto em T elevado	29
3.8.2. Campo aberto	31

3.8.3. Teste de esconder esferas.....	32
3.9. Delineamento Experimental	33
3.9.1. Experimento 1 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE	33
3.9.2. Experimento 2 - Efeito da administração de N/OFQ no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE	34
3.9.3. Experimento 3 - Influência do pré-tratamento com N/OFQ no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	34
3.9.4. Experimento 4 - Influência do pré-tratamento com bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	35
3.9.5. Experimento 5 - Influência do pré-tratamento com fosforamidon no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	36
3.9.6. Experimento 6 - Influência do pré-tratamento com fosforamidon e bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE	37
3.9.7. Experimento 7 - Influência do pré-tratamento com PCPA no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral em ratos Wistar avaliados no LTE.....	38
3.9.8. Experimento 8 - Efeito da administração de UFP-101 no NDR de ratos Wistar submetidos ao LTE.....	40
3.9.9. Experimento 9 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley submetidos ao TEE e ao CA.....	41
3.9.10. Experimento 10 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley	42
3.9.11. Experimento 11 - Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley no TEE e no CA.....	43

3.9.12. Experimento 12 – Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC ..	44
3.10. Histologia.....	45
3.10.1. Verificação dos sítios de injeção	45
3.10.2. Marcação da área de registro e verificação histológica.....	46
3.11. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	48
4.1. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE	48
4.2. Efeito da administração de N/OFQ no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE.....	50
4.3. Influência do pré-tratamento com N/OFQ no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	52
4.4. Influência do pré-tratamento com bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	54
4.5. Influência do pré-tratamento com fosforamidon no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE.....	56
4.6. Influência do pré-tratamento com fosforamidon e bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE	58
4.7. Influência do pré-tratamento com PCPA no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral em ratos Wistar avaliados no LTE	60
4.8. Efeito da administração de UFP-101 no NDR de ratos Wistar submetidos ao LTE	62
4.9. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley submetidos ao TEE e ao CA	64
4.10. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley	65

4.11. Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley no TEE e no CA	67
4.12. Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC.....	68
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8. APÊNDICE.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade

A ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, difuso ou vago, freqüentemente acompanhado por uma ou mais sensações físicas, como aumento na pressão arterial, freqüência cardíaca, e respiração, urgência de micção ou defecação, induzido pela expectativa de perigo, dor ou necessidade de um esforço especial. A inquietação e o desejo de movimentar-se são também comuns. A ansiedade é também um impulso motivacional fundamental em muitas formas de comportamento e, como o medo, tem importante significado adaptativo e evolutivo (Brandão, 2001).

Entretanto, a ansiedade difere conceitualmente do medo. O medo refere-se às respostas comportamentais e neurovegetativas decorrentes de uma ameaça física ou à própria sobrevivência do organismo, se manifestando em situações onde o perigo é iminente pela presença imediata do objeto ou da situação temida. A ansiedade, por outro lado, é um estado de apreensão diante de circunstâncias onde o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente, estando ligada a uma expectativa futura desproporcional, ou quando os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos (Graeff, 1999b). Para Gray e McNaughton (2000) o fator crítico que distingue medo e ansiedade parece ser o que pode ser chamado de “direção defensiva”. Enquanto o medo opera para permitir que o animal saia de uma situação perigosa (esquiva ativa), a ansiedade opera para permitir (e.g., avaliação de risco) ou impedir (esquiva passiva) que o animal entre em uma situação perigosa.

Quando a ansiedade está presente em níveis maiores do que os considerados normais e benéficos, prejudicando as funções fisiológicas e cognitivas, deixa de ser um mecanismo de defesa normal e passa a ser tratada como um transtorno, com necessidade de intervenção farmacológica e/ou psicológica (Brandão, 2001; Graeff, 1999b).

O transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de pânico estão entre os transtornos de ansiedade classificados pela Associação Psiquiátrica Americana (*American Psychiatry Association*, 2000). Segundo a 4ª edição revisada do Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais (DSM-IV-TR, 2000), desta associação, o transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado por uma preocupação excessiva e inapropriada que persiste por mais de seis meses e não está restrita a circunstâncias específicas. Enquanto, o transtorno de pânico (com ou sem agorafobia) é caracterizado por um estado de apreensão

intenso, medo ou terror, de início súbito e recorrente. Sendo que, aproximadamente dois terços dos pacientes com pânico desenvolvem agorafobia, medo de lugares ou situações nas quais a fuga pode ser difícil ou ainda pode ser difícil conseguir ajuda. Além disso, muitos pacientes desenvolvem um medo de ter futuros ataques de pânico (Baldwin et al., 2005; Graeff, 1999b).

Estudos epidemiológicos realizados em vários países da Europa, em populações na faixa etária entre 18 e 65 anos, estimaram uma prevalência de 1,5% ao ano e 5,1% ao longo da vida para o transtorno de ansiedade generalizada e de 2,3% ao ano e 3,8% ao longo da vida para o transtorno de pânico, sendo cerca de duas vezes mais freqüente em mulheres que em homens (Baldwin et al., 2005; Kinrys e Wygant, 2005; Wittchen e Jacobi, 2005). Nos Estados Unidos, americanos adultos são acometidos pelos transtornos de ansiedade generalizada e pânico nas proporções de 2,1% e 2,1% ao ano e 4,1% e 5,1% ao longo da vida, respectivamente (Grant et al., 2005, 2006). No Brasil, mais especificamente na cidade de São Paulo, a estimativa de prevalência é de 1,7% ao ano e 4,2% ao longo da vida para o transtorno de ansiedade generalizada e de 1% ao ano e 1,6% ao longo da vida para o transtorno de pânico (Andrade et al., 2002).

Charles Darwin, em seu livro “A expressão das emoções nos homens e nos animais”, publicado em 1872, propôs que as características comportamentais dos animais podem ser adquiridas, como as características físicas, como resultado da pressão seletiva exercida pela evolução biológica. Sob essa perspectiva, os estados emocionais de ansiedade e medo expressos pelos seres humanos teriam raízes nas reações defensivas apresentadas pelos animais e compartilhados em uma escala filogenética. Por isso, o estudo das reações defensivas de animais de laboratório em situações de perigo e ameaça permite a analogia da ansiedade exibida pelo homem (Brandão et al., 2003; Graeff, 1999a; Graeff e Zangrossi, 2002). São várias as fontes de ameaça a integridade física ou a sobrevivência do organismo e incluem: predadores; estímulos ambientais, como altura e claridade; estímulos dolorosos, como choques elétricos; novos lugares ou objetos; e confronto ou competição com animais da mesma espécie (Blanchard e Blanchard, 2008; Graeff e Zangrossi, 2002). A decisão para escolher uma estratégia em particular leva em consideração muitos fatores que incluem as características do ambiente, a distância do estímulo ameaçador e a experiência prévia com o estímulo e/ou com o ambiente (Blanchard e Blanchard, 2008; Graeff e Zangrossi, 2002). As respostas defensivas exibidas pelos animais variam entre a fuga, esquiva,

congelamento, ataque defensivo, avaliação de risco, e o ato de esconder/enterrar objetos potencialmente perigosos (Blanchard e Blanchard, 2008).

1.1.1. Tratamentos Farmacológicos dos Transtornos de Ansiedade

A farmacoterapia e a psicoterapia, isoladas ou em associação, são utilizadas no tratamento dos transtornos de ansiedade. Atualmente, os fármacos usados no tratamento dos transtornos de ansiedade são: os benzodiazepínicos, a bupirona e os antidepressivos.

Desde a comercialização do primeiro benzodiazepínico, o clordiazepóxido, em 1960 até o final dos anos 90 os benzodiazepínicos foram as drogas de primeira escolha no tratamento dos transtornos de ansiedade, em especial nos de ansiedade generalizada e pânico (Argyropoulos et al., 2000; López-Muñoz et al., 2011; Uhlenhuth et al., 1999). Os benzodiazepínicos apresentam a vantagem de ter um início de ação rápido. Por outro lado, o uso prolongado dos benzodiazepínicos pode promover tolerância, dependência e sintomas de retirada, como ansiedade, irritabilidade e insônia, além de efeitos indesejados, tais como sonolência, amnésia e prejuízos na coordenação (Argyropoulos et al., 2000; Davidson, 2001).

A ação ansiolítica dos benzodiazepínicos é proveniente de sua interação com o sítio benzodiazepínico localizado no complexo receptor GABA_A. Usando técnicas de biologia molecular (camundongos *knockout* e *knockin*) têm-se demonstrado que a subunidade $\alpha 2$ desse receptor exerce um papel importante no efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos, enquanto as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 5$ no efeito sedativo e processos mnemônicos, respectivamente (Burt, 2003; Whiting, 2003). Assim, o desenvolvimento de novos fármacos que atuem seletivamente na subunidade $\alpha 2$ poderia reduzir os efeitos indesejados dos atuais benzodiazepínicos.

A bupirona é um agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}. Nos ensaios pré-clínicos os resultados obtidos com a bupirona são variáveis, a ponto de apresentar em um mesmo teste experimental, o labirinto em cruz elevado, efeito do tipo ansiolítico e ansiogênico (Pinheiro et al., 2007). Na clínica, a bupirona demonstrou ser efetiva no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (Argyropoulos et al., 2000; Chessick et al., 2006). Quando comparado aos benzodiazepínicos, a bupirona apresenta início de ação mais demorado (de 2 a 3 semanas) e seus efeitos indesejados incluem náusea, tontura e dor de cabeça (Argyropoulos et al., 2000). Entretanto, a bupirona não promove

tolerância, dependência ou síndrome de abstinência, além de não causar sedação ou incoordenação motora (Argyropoulos et al., 2000). Apesar desse perfil favorável, o uso clínico da bupiriona não conseguiu superar ao dos benzodiazepínicos no tratamento dos transtornos de ansiedade (Chessick et al., 2006; Uhlenhuth et al., 1999).

Como o próprio nome indica, os antidepressivos foram introduzidos na terapêutica para o tratamento da depressão maior, mas gradualmente passaram a ser utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade (Graeff, 1999b). Diferentes estudos sugerem uma similaridade genética e neurobiológica entre distúrbios depressivos e transtornos de ansiedade. Pacientes com transtornos de ansiedade, como os de ansiedade generalizada e de pânico, são frequentemente diagnosticados com distúrbios depressivos (Gorman, 1996; Montgomery e Judge, 2000).

Atualmente, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), por possuírem um amplo espectro de eficácia ansiolítica e por serem bem tolerados, são as drogas de primeira escolha no tratamento dos transtornos de ansiedade. Entretanto, apresentam efeitos indesejados como nervosismo inicial, insônia, náusea e disfunção sexual, além de apresentarem um início de ação demorado – de 4 a 6 semanas (Baldwin et al., 2005). Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN), como a venlafaxina, são uma alternativa aos ISRS no tratamento dos transtornos de ansiedade (Dell’Osso et al., 2010). Outras classes de antidepressivos (tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase) são deixadas em segundo plano, apesar de apresentarem eficácia no tratamento de alguns transtornos de ansiedade, como transtorno de pânico e obsessivo compulsivo, por possuírem efeitos adversos mais acentuados ou necessitarem de restrição alimentar (Argyropoulos et al., 2000; Baldwin et al., 2005).

1.1.2. Novos Tratamentos dos Transtornos de Ansiedade

Embora existam muitos tratamentos farmacológicos e psicoterapias disponíveis para o tratamento de pacientes com transtornos de ansiedade, os resultados clínicos estão longe dos ideais (Garner et al., 2009). Assim, novas pesquisas continuam sendo necessárias para buscar compostos ansio-seletivos alternativos com menor potencial a induzir reações adversas (Fricchione, 2004). Nesse contexto, surgem como alvos terapêuticos atrativos para o tratamento dos transtornos de ansiedade as plantas medicinais, os moduladores seletivos dos receptores glutamatérgicos e os neuropeptídeos.

Atualmente, a grande maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento dos transtornos de ansiedade não são derivados de plantas medicinais, apesar das inúmeras possibilidades terapêuticas oferecidas ao longo dos anos (Kumar, 2006). A *Piper methysticum* (Kava-kava) é um dos poucos produtos fitoterápicos utilizados no tratamento clínico da ansiedade (Gastpar e Klimm, 2003). Isso não inviabiliza, pelo contrário, encoraja a pesquisa, identificação e desenvolvimento de drogas para o tratamento dos transtornos de ansiedade a partir de plantas medicinais.

Ensaio pré-clínicos têm demonstrado que ligantes dos receptores glutamatérgicos, em especial antagonistas NMDA, apresentam efeitos do tipo ansiolítico, mas seus severos efeitos adversos na clínica, como prejuízos cognitivos e comportamentos semelhantes à esquizofrenia, são desencorajadores (Bergink et al., 2004). Entretanto, moduladores seletivos dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu), como moduladores alostéricos positivos dos mGlu do grupo II, têm sido propostos como novos alvos terapêuticos para o tratamento dos transtornos de ansiedade, pois não apresentam alguns dos efeitos indesejados dos antagonistas NMDA (Gregory et al., 2011).

1.2. Neuropeptídeos e Ansiedade

Os neuropeptídeos são neurotransmissores ou neuromoduladores constituídos de 3 a 100 resíduos de aminoácidos, podendo ser até 50 vezes maior que os neurotransmissores clássicos. Devido ao tamanho, os neuropeptídeos possuem mais sítios de reconhecimento nos seus receptores e mais informações químicas que os neurotransmissores clássicos. Além disso, são cerca de 1.000 vezes mais potentes que os neurotransmissores clássicos, pois a ligação dos neuropeptídeos aos seus receptores ocorre em uma faixa de concentração de nmol/L, enquanto a dos neurotransmissores clássicos ocorre na faixa de μ mol/L (Hökfelt et al., 2003).

Existem várias diferenças entre os neuropeptídeos e os neurotransmissores clássicos no sistema nervoso em relação à síntese, armazenamento e sinalização (Hökfelt et al., 2003). Por exemplo, os neuropeptídeos quase sempre coexistem com outros neurotransmissores no interior do mesmo neurônio em compartimentos sub-celulares (LDCVs). Além disso, a liberação do neuropeptídeo requer altas frequências de descarga, e uma vez liberado essas moléculas podem alcançar receptores distantes do sítio de liberação, a chamada transmissão por volume (Hökfelt et al., 2003). Por essas razões, os neuropeptídeos podem ser liberados seletivamente sob determinados

estímulos e, conseqüentemente, produzir respostas com diferentes amplitudes, durações e sinais (Nusbaum et al., 2001).

Diferente de outros transmissores que possuem um mecanismo de recaptação, os neuropeptídeos têm geralmente suas atividades peptídicas terminadas por enzimas proteolíticas, também chamadas de peptidases, proteases ou proteinases (García-López et al., 2002). Essas enzimas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas e podem ser divididas em exopeptidases e endopeptidases. Sendo que, as exopeptidases catalisam a hidrólise das ligações próximas às extremidades amino(N)-terminal e carboxi(C)-terminal da cadeia polipeptídica, como as aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidil aminopeptidase. Enquanto, as endopeptidases catalisam a hidrólise das ligações internas da cadeia polipeptídica, tais como as serina (treonina) endopeptidases, cisteína endopeptidases e metaloendopeptidases (García-López et al., 2002). Entretanto, a ação dessas enzimas, além de formar metabólitos inativos, pode resultar na formação de fragmentos que mantêm a atividade farmacológica do peptídeo natural (Miwa et al., 2010; Sandin et al., 1999) ou ainda originar fragmentos com atividade farmacológica distinta do peptídeo natural (De Araujo et al., 2001).

Várias evidências têm demonstrado que os neuropeptídeos são de particular importância quando o sistema nervoso é desafiado ou está tentando se adaptar a situações variadas, como no estresse ou no abuso de drogas. Essas características aliadas ao grande número de neuropeptídeos e a ampla distribuição de seus receptores fornecem muitas oportunidades para a descoberta de novas drogas para o tratamento dos transtornos do sistema nervoso (Hökfelt et al., 2003).

A lista de neuropeptídeos envolvidos com os processos emocionais está cada vez maior (para revisão detalhada ver Rotzinger et al., 2010). Desses neuropeptídeos, o fator de liberação da corticotropina (CRF, do inglês *corticotropin releasing factor*), o neuropeptídeo Y, a substância P, a colecistocinina e a arginina vasopressina estão entre os mais estudados (Holmes et al., 2003). Nos últimos anos, o envolvimento dos peptídeos opióides, em especial o sistema nociceptina/orfanina FQ-receptor NOP, tem recebido especial atenção. Na Tabela 1 observam-se os efeitos de agonistas e antagonistas de vários sistemas peptidérgicos em diferentes testes de ansiedade.

Tabela 1 – O papel dos neuropeptídeos e de seus receptores em diferentes testes de ansiedade.

Neuropeptídeo	Ligantes dos Receptores	Efeito	Referências
Fator de Liberação da Corticotropina (CRF)*	<u>Antagonistas CRF₁</u> :		
	CP154,526, R, I.P., LCE	0	Millan et al., 2001
	CP154,526, R, I.P., teste de conflito de Vogel	-	Millan et al., 2001
	CRA 1000 e CRA 1001, C, V.O., estresse + LCE	†	Okuyama et al., 1999
	CRA 1000 e CRA 1001, C, V.O., caixa claro-escuro	0	Okuyama et al., 1999
	CRA 1000 e CRA 1001, C, V.O., estresse + caixa claro-escuro	†	Okuyama et al., 1999
	DMP695, R, S.C., LCE	0	Millan et al., 2001
	DMP695, R, S.C., teste de conflito de Vogel	-	Millan et al., 2001
	NBI3b1996, R, I.P., interação social	0	Gehlert et al., 2005
	NBI3b1996, R, I.P., estresse + interação social	†	Gehlert et al., 2005
Neuropeptídeo Y (NPY)**	<u>NPY</u> :		
	C, V.L., LCE	-	Karlsson et al., 2005
	R, V.L., LCE	-	Broqua et al., 1995
	C, V.L., caixa claro-escuro	-	Karlsson et al., 2005
	<u>Agonista Y₁</u> :		
	[D-His(26)]NPY, R, V.L., CA	-	Sorensen et al., 2004
Substância P***	<u>Antagonista Y₁</u> :		
	BIBP3226, R, V.L., LCE	+	Kask et al., 1998
	BIBP3226, R, SCPD, LCE	+	Kask et al., 1998
	<u>SP</u> :		
	C, V.L., LCE	+	Teixeira et al., 1996
	R, V.L., LCE	+	Duarte et al., 2004
	R, H.D., LCE	-	Carvalho et al., 2008
	<u>Antagonistas NK₁</u> :		

	FK888, C, V.L., LCE	-	Teixeira et al., 1996
	MK-869, G, V.O., LCE	-	Varty et al., 2002
Colecistocinina (CCK)[•]	<u>Antagonistas CCK₂:</u>		
	L-365,260, C, I.P., LCE	-	Rataud et al., 1991
	L-365,260, R, I.P., LCE	-	Singh et al., 1991
	PD134308, R, S.C., LCE	-	Hughes et al., 1990
	PD134308, C, S.C., caixa claro-escuro	-	Hughes et al., 1990
	PD134308, R, S.C., interação social	-	Hughes et al., 1990
Arginina-vasopressina (AVP)^{••}	<u>Antagonista V1a:</u>		
	JNJ-17308616, R, I.P., LCE	-	Bleickardt et al., 2009
	JNJ-17308616, C, I.P., TEE	-	Bleickardt et al., 2009
	<u>Antagonista V1b:</u>		
	SSR149415, R, V.O., LCE	-	Griebel et al., 2002
	SSR149415, R, I.P., LCE	-	Hodgson et al., 2007
	SSR149415, R, V.O., interação social	-	Shimazaki et al., 2006
Peptídeos opióides^{•••}	<u>Antagonista κ opióide:</u>		
	DIPPA, R, S.C., hipofagia induzida pela novidade	-	Carr e Lucki, 2010
	DIPPA, R, S.C., enterro defensivo condicionado	-	Carr e Lucki, 2010
	norBinaltorfimina, R, I.P., LCE	-	Knoll et al., 2007
	norBinaltorfimina, C, I.P., LCE	-	Wittmann et al., 2009

Abreviações: 0 = sem efeito; - = efeito do tipo ansiolítico; + = efeito do tipo ansiogênico; † = bloqueia o efeito do tipo ansiogênico do estresse; C = camundongo; G = gerbilos; H.D. = hipocampo dorsal; I.P. = intraperitoneal; LCE = labirinto em cruz elevado; R = rato; S.C. = subcutâneo; SCPD = substância cinzenta periaquedutal dorsal; V.L. = ventrículo lateral; V.O. = via oral.

*O CRF é um peptídeo composto por 41 aminoácidos e seus efeitos biológicos são mediados por dois receptores CRF₁ e CRF₂ (CRF_{2a} e CRF_{2b}). Em geral, os efeitos ansiolíticos são produzidos por antagonistas CRF₁ e dependem das condições basais de ansiedade e da natureza do teste de ansiedade (Rotzinger et al., 2010).

^{**}O NPY é um peptídeo composto por 36 aminoácidos. Existem atualmente cinco receptores NPY identificados (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 e y_6 – todos acoplados a proteína G). O NPY e seus receptores estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Os efeitos ansiolíticos do NPY (via receptores Y_1 e Y_5) são bem documentados, fornecendo fortes evidências do papel do NPY na modulação das respostas relacionadas com ansiedade (Rotzinger et al., 2010). ^{***}A SP, um peptídeo composto por 11 aminoácidos, é o agonista preferencial do receptor NK_1 . Os efeitos da SP nos testes de ansiedade são variáveis na dependência da área cerebral injetada e da dose. Antagonistas NK_1 têm demonstrado efeitos do tipo ansiolítico em diferentes ensaios pré-clínicos de ansiedade. E, atualmente, ensaios clínicos com antagonistas NK_1 estão em andamento (Rotzinger et al., 2010). [•]Há uma variedade de formas biologicamente ativas de CCK (de 4 a 58 aminoácidos), derivadas de uma grande molécula precursora (pró-CCK, com 115 aminoácidos). A CCK liga-se a dois receptores, CCK_1 e CCK_2 (primeiramente chamados de CCKA e CCKB, respectivamente). Resultados pré-clínicos têm demonstrado que as CCK_4 e CCK_{8S} , através da ativação de receptores CCK_2 , apresentam efeitos do tipo ansiogênico em diferentes testes experimentais (Rotzinger et al., 2010). E, embora os antagonistas da CCK_4 tenham bloqueado os efeitos do tipo ansiogênico da administração de CCK, a eficácia desses compostos não tem sido demonstrada em ensaios placebo-controlado em pacientes com transtornos de ansiedade (Garner et al., 2009). ^{••}A AVP é um peptídeo composto por 9 aminoácidos, que exerce um importante papel na regulação da pressão arterial e no balanço hídrico. Entretanto, a interação sinérgica da AVP com o CRF em regular o eixo HPA têm levado muitos pesquisadores a sugerir um envolvimento da AVP nos transtornos de ansiedade e depressão. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que antagonistas V_{1a} e V_{1b} apresentam efeitos do tipo ansiolítico em diferentes testes de ansiedade (Rotzinger et al., 2010). ^{•••}Os ligantes endógenos dos receptores opióides são derivados de 3 proteínas precursoras diferentes: proopiomelanocortina, proencefalina e prodinorfina. Os peptídeos e seus derivados, formados do processamento apropriado dessas proteínas precursoras, *e.g.*, leu- e met-enkefalina, dinorfina A e β -endorfina, exibem diferente afinidade e seletividade para os receptores μ (mu), δ (delta) e κ (kappa) ou MOP, DOP e KOP, respectivamente (Mansour et al., 1995). Nos últimos anos diferentes estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores κ -opióide nos transtornos de ansiedade (Carr e Lucki, 2010).

1.2.1. Nociceptina/orfanina FQ e o receptor NOP

A nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um neuropeptídeo composto por 17 aminoácidos, cuja sequência está intimamente relacionada à dos peptídeos opióides endógenos, particularmente a dinorfina A (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). A N/OFQ é derivada de uma grande molécula precursora, a prepronociceptina/orfanina (ppN/OFQ), que também é precursora de outros peptídeos bioativos, tais como a nociceptina/orfanina FQ II (N/OFQ II) e a nocistatina (Mollereau et al., 1996; Okuda-Ashitaka e Ito, 2000).

Apesar da similaridade com os peptídeos opióides endógenos, a N/OFQ não se liga aos receptores opióides clássicos (MOP, DOP e KOP). A N/OFQ se liga com alta seletividade ao seu receptor, denominado receptor NOP [primeiramente chamado de ORL1 (do inglês, *opioid receptor-like receptor 1*)]. O receptor NOP é um membro da superfamília de receptores acoplados a proteína G. A ativação do receptor NOP com o agonista endógeno N/OFQ inibe a atividade da adenilil ciclase e dos canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem, e estimula os canais de K^{+} . Deste modo, a ativação do receptor NOP reduz a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores, efeitos semelhantes aos dos peptídeos opióides (para revisão ver Hawes et al., 2000).

Entretanto, apesar das evidências de homologia funcional e evolutiva, o receptor NOP não é um receptor opióide do ponto de vista farmacológico, já que agonistas e antagonistas opióides, como a naloxona, exibem baixa ou nenhuma afinidade de ligação pelo receptor NOP (Calo' et al., 2000c; Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Nesse sentido, um subcomitê da União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) sugeriu que o receptor NOP seja considerado como uma ramificação não-opióide da família dos receptores opióides (Cox et al., 2010).

A N/OFQ e o receptor NOP estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Níveis elevados de RNAm da ppN/OFQ e do peptídeo N/OFQ foram encontrados no neocórtex, *claustrum*, septo lateral, núcleo intersticial da estria terminal, núcleos central e medial da amígdala, hipocampo, núcleo reticular do tálamo, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância negra, área tegmental ventral, núcleo interpeduncular, loco cerúleo (LC), núcleos da rafe, bem como em vários núcleos sensoriais e motores do tronco cerebral e nas colunas dorsal e ventral da medula espinhal (Boom et al., 1999; Neal et al., 1999). Níveis elevados de expressão do receptor NOP, detectados

através das técnicas de hibridização *in situ*, imunohistoquímica e autoradiografia, foram encontrados no córtex cerebral, núcleo olfatório anterior, na concha do núcleo *accumbens*, tálamo, hipotálamo, formação hipocampal, complexo amigdalóide, septo medial, núcleos serotoninérgico e noradrenérgico, como o dorsal da rafe e o LC, respectivamente, substância cinzenta periaquedutal e na medula espinhal (para revisão ver Mollereau e Mouledous, 2000). Além disso, a distribuição do receptor NOP geralmente combina com a distribuição do peptídeo N/OFQ (Darland et al., 1998) e um padrão correspondente na expressão do receptor NOP e da N/OFQ foi observado entre o sistema nervoso central de roedores e de humanos (Peluso et al., 1998; Witta et al., 2004).

A ampla distribuição da N/OFQ e de seu receptor NOP estimulou vários grupos de pesquisa a investigar o envolvimento desse sistema em uma série de processos neurofisiológicos e comportamentais. Os resultados dos estudos com a administração intracerebral de N/OFQ, o uso de animais que não expressam o receptor NOP ou o precursor da N/OFQ, bem como o desenvolvimento de ligantes peptídicos e não-peptídicos que atuam como agonistas ou antagonistas seletivos do receptor NOP, forneceram suporte para o papel modulatório da N/OFQ em processos como a nocicepção (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995), o comportamento alimentar (Polidori et al., 2000), os processos de aprendizagem e memória (Noda et al., 2000), a atividade locomotora (Reinscheid et al., 1995), as ações de recompensa e reforço promovidas pelos opióides (Murphy et al., 1999) e pelo etanol (Ciccocioppo et al., 2000), e ainda nas respostas ao estresse e à ansiedade (Jenck et al., 1997).

1.2.2. Nociceptina/orfanina FQ e ansiedade

Vários estudos demonstraram que a administração central de N/OFQ promove efeitos do tipo ansiolítico em diferentes testes de ansiedade (para revisão ver Gavioli e Calo', 2006). O primeiro relato do efeito do tipo ansiolítico da N/OFQ foi obtido por Jenck e colaboradores (1997), que observaram que a administração no ventrículo lateral de N/OFQ na faixa de doses de 0,1 - 3 nmol (não sedativa) atenuava a inibição comportamental quando animais eram expostos a condições estressantes.

Assim, a N/OFQ aumentou o tempo gasto no compartimento claro da caixa claro-escuro, a taxa de respostas punidas no teste de conflito operante, a exploração dos espaços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), além de reverter à inibição comportamental induzida por urocortina (agonista do receptor CRF₁) em um ambiente

não familiar. Mais tarde, outros laboratórios confirmaram o efeito do tipo ansiolítico da administração no ventrículo lateral de N/OFQ em camundongos na bateria de testes defensivos (Griebel et al., 1999), no LCE (Gavioli et al., 2002) e no teste da placa perfurada (“hole-board test”; Kamei et al., 2004).

Similar aos efeitos da administração central da N/OFQ, Jenck e colaboradores (2000) demonstraram que a administração intraperitoneal de Ro64-6198, um agonista não-peptídico seletivo do receptor NOP, na faixa de doses de 0,1 a 3 mg/Kg, promoveu um efeito do tipo ansiolítico, semelhante ao dos benzodiazepínicos, nos modelos do LCE, do teste de conflito operante e do sobressalto potencializado pelo medo em ratos. Porém, diferente dos benzodiazepínicos, baixas doses de Ro64-6198 não interferiram no desempenho motor e na função cognitiva. Varty e colaboradores (2005) demonstraram que o efeito do tipo ansiolítico do Ro64-6198 é bloqueado pelo antagonista do receptor NOP J-113397 e estava ausente em camundongos *knockout* para o receptor NOP (NOP^{-/-}). Além disso, nenhum sinal de tolerância ao efeito do tipo ansiolítico do Ro64-6198 foi observado após 15 dias de tratamento (Dautzenberg et al., 2001).

Em contraste aos resultados mostrados anteriormente, Fernandez e colaboradores (2004) encontraram um efeito do tipo ansiogênico após administração de N/OFQ no ventrículo lateral, na mesma faixa de doses utilizada por Jenck e colaboradores (1997), em ratos avaliados no LCE, no campo aberto (CA) e na caixa claro-escuro. Como nenhuma diferença significativa foi observada em relação à linhagem de animais utilizada e às condições experimentais, as razões para essa diferença de resultados são desconhecidas. Mais tarde, Green e colaboradores (2007) também demonstraram um efeito do tipo ansiogênico após a administração no ventrículo lateral (0,01, 0,1 e 1 nmol), na amígdala (0,1 e 1 nmol) ou no núcleo do leito da estria terminal (1 nmol) de N/OFQ em ratos avaliados no CA. Ainda, Mamiya e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos NOP^{-/-} não apresentaram qualquer diferença significativa em relação aos comportamentos apresentados por camundongos *wild-type* (NOP^{+/+}) no LCE.

1.2.3. UFP-101

O [Nphe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂, nomeado de UFP-101, é um neuropeptídeo sintético composto por 17 aminoácidos, cuja sequência de aminoácidos está intimamente relacionada a da N/OFQ (Figura 1).

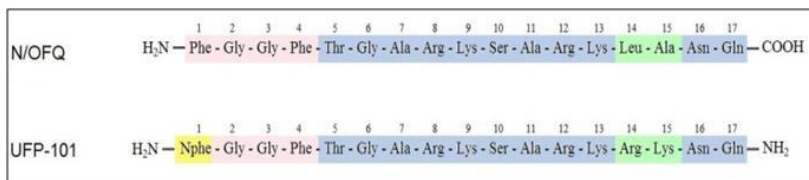


Figura 1 - Sequência de aminoácidos da N/OAQ e do UFP-101. Adaptado de Lambert, 2008.

Diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o UFP-101 atua como um antagonista competitivo do receptor NOP (para revisão ver Calo' et al., 2005). Em alguns desses estudos *in vitro* o UFP-101 antagonizou competitivamente, sem apresentar efeito *per se*, as ações celulares induzidas pela N/OAQ ao ativar o receptor NOP, *e.g.*, o UFP-101 bloqueou a diminuição promovida pela N/OAQ das contrações induzidas eletricamente do ducto deferente de camundongo e rato (Calo' et al., 2002). *In vivo*, o UFP-101 tem sido confrontado com a N/OAQ em uma série de estudos com o objetivo de investigar os papéis do sistema N/OAQ-receptor NOP na modulação das várias funções biológicas (Calo' et al., 2005).

Na Tabela 2 observam-se alguns dos efeitos *in vivo* do UFP-101 e suas interações com o peptídeo N/OAQ, que incluem a nocicepção, atividade locomotora, ingestão de alimentos, função cardiovascular e excreção renal.

Tabela 2 – Efeitos do UFP-101 *in vivo* e as interações com a N/OFQ.

Teste/Ensaio	Efeito da N/OFQ	Efeito do UFP-101	Referência
Teste de retirada da cauda (C, V.L.)	<u>1,0 nmol</u> : ↓ a latência de retirada da cauda	<u>3,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas bloqueou o efeito da N/OFQ 1,0 nmol <u>10,0 nmol</u> : ↑ a latência de retirada da cauda	Calo' et al., 2002
Teste de retirada da cauda (C, I.T.)	<u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↑ a latência de retirada da cauda	<u>10,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas bloqueou o efeito da N/OFQ 1,0 nmol	Nazarro et al., 2007
Teste da formalina (R, V.L.)	<u>0,5 – 10,0 nmol</u> : aumentou as respostas nociceptivas durante as fases I e II do teste	-	Zhu et al., 1997
Teste da formalina (C, V.L.)	-	<u>1,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> <u>10,0 nmol</u> : diminuiu as respostas nociceptivas durante a fase II do teste	Rizzi et al., 2006
Teste da formalina (R, I.T.)	<u>1,7 nmol</u> : diminuiu as respostas nociceptivas durante as fases I e II do teste	-	Yamamoto et al., 1997
Teste da formalina (C, I.T.)	-	<u>1,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> <u>10,0 nmol</u> : aumentou as respostas nociceptivas durante a fase II do teste	Rizzi et al., 2006
Teste do campo aberto (C, V.L.)	<u>1,0 nmol</u> : ↓ a atividade locomotora espontânea	<u>3,0 e 10,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas bloquearam o efeito da N/OFQ 1,0 nmol	Calo' et al., 2002

Teste do campo aberto (C, V.L.)	<u>0,1 e 0,5</u> : ↑ a atividade locomotora espontânea <u>1,0 nmol</u> : sem efeito <u>5,0 e 10,0</u> : ↓ a atividade locomotora espontânea	<u>10,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> mas bloqueou o efeito da N/OFQ 0,1 e 5,0 nmol	Kuzmin et al., 2004
Teste do rota-rod (R, V.L.)	<u>0,01 nmol</u> : ↑ desempenho motor <u>0,1, 1,0, 10,0 nmol</u> : ↓ o desempenho motor	<u>0,1 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas preveniu o efeito da N/OFQ 0,01 nmol <u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↑ o desempenho motor	Marti et al., 2009
Teste do rota-rod (R, SNr)	<u>0,1, 1,0 e 10,0 nmol</u> : ↓ desempenho motor	<u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↑ desempenho motor	Marti et al., 2004b, 2005
Teste de velocidade (R, V.L.)	<u>0,01 nmol</u> : ↑ a velocidade <u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↓ a velocidade	<u>0,1 e 1,0 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas o UFP-101 0,1 nmol preveniu o efeito da N/OFQ 0,01 nmol <u>10,0 nmol</u> : ↑ a velocidade	Marti et al., 2009
Teste de velocidade (R, SNr)	<u>0,01 nmol</u> : ↑ a velocidade <u>0,1, 1,0 e 10,0 nmol</u> : ↓ a velocidade	<u>0,1 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas preveniu o efeito da N/OFQ 0,01 nmol <u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↑ a velocidade	Marti et al., 2009
Eletromiografia (R, SNr)	<u>10,0 nmol</u> : ↓ tônus muscular do tríceps	<u>30,0 nmol</u> : ↑ tônus muscular do tríceps;	Marti et al., 2004b
Microdálise (R, SNr)	<u>10,0 nmol</u> : ↓ o conteúdo de dopamina no estriado	<u>30,0 nmol</u> : ↑ o conteúdo de dopamina no estriado	Marti et al., 2004b
Microdálise		<u>30,0 nmol</u> : normalizou o	Marti et al., 2004a

(R, SNr)	-	conteúdo de glutamato na SNr aumentado pelo haloperidol (0,8 mg/Kg, I.P.)	
Teste de catalepsia (C, V.L.)	-	<u>10,0 nmol</u> : ↓ a acinesia induzida pelo haloperidol (0,8 mg/Kg, I.P.), quando medida pelo tempo de imobilidade no teste da barra	Mabrouk et al., 2010
Teste de catalepsia (R, SNr)	-	<u>30,0 nmol</u> : ↓ a acinesia induzida pelo haloperidol (0,8 mg/Kg, I.P.), quando medida pelo tempo de imobilidade no teste da barra	Marti et al., 2004a
Degeneração unilateral de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-OHDA (R, SNr)	-	<u>10,0 e 30,0 nmol</u> : ↓ a acinesia, quando medida pelo tempo de imobilidade no teste da barra <u>1,0 e 10,0 nmol</u> : ↑ desempenho motor no teste do rota-rod	Marti et al., 2005
Ingestão de alimentos (g/Kg de peso corporal) (R, V.L.)	<u>1,68 e 6,07 nmol</u> : ↑ a ingestão de alimentos	<u>1,85, 3,7 e 7,4 nmol</u> : sem efeito <i>per se</i> , mas preveniram o efeito hiperfágico da N/OFQ 1,68 nmol	Economidou et al., 2006
Função cardiovascular (C, V.L.)	<u>1,0 e 3,0 nmol</u> : ↓ a FC e a PA	<u>10,0 e 30,0 nmol</u> : ↑ a FC e sem efeito <i>per se</i> na PA <u>10,0 e 30,0 nmol</u> : preveniram o efeito da N/OFQ 1,0 e 3,0 nmol na PA	Burmeister e Kapusta, 2007

Função cardiovascular (Co, E.V.)	<u>0,25, 1,25, 6,25 e 25,0 nmol:</u> ↓ a FC e a PA	<u>60,0 nmol:</u> sem efeito <i>per se</i> na FC e na PA, mas bloqueou o efeito da N/OFQ 6,25 nmol na FC e PA	Hashiba et al., 2003
Excreção renal (cc/2hr) (C, V.L.)	<u>1,0 e 3,0 nmol:</u> ↑ o volume urinário	<u>10,0 e 30,0 nmol:</u> sem efeito <i>per se</i> , mas preveniram o efeito da N/OFQ 1,0 e 3,0 nmol no volume urinário	Burmeister e Kapusta, 2007

Abreviações: C = camundongo; Co = cobaia; E.V. = endovenoso; FC = frequência cardíaca; I.P. = intraperitoneal; I.T. = intratecal; PA = pressão arterial; R = rato; SNr = substância negra *pars reticulata*; V.L. = ventrículo lateral; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina.

Em 2003, Gavioli e colaboradores demonstraram pela primeira vez, usando o teste do nado forçado [teste animal amplamente utilizado na triagem de potenciais antidepressivos (Cryan et al., 2002)], que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 nas doses de 3 e 10 nmol produziu em camundongos um efeito do tipo antidepressivo, isto é, reduziu o tempo de imobilidade. Esse efeito do UFP-101 era prevenido pela co-administração de N/OFQ (1 nmol, dose sem efeito *per se*) indicando que o efeito do UFP-101 ocorre via receptores NOP. Um ano mais tarde, Gavioli e colaboradores (2004) estenderam esses efeitos do UFP-101 10 nmol e da N/OFQ 1 nmol para ratos no teste do nado forçado e camundongos no teste de suspensão pela cauda. Recentemente, Vitale e colaboradores (2009) demonstraram que os efeitos comportamentais (anedonia) e bioquímicos (aumento nos níveis circulantes de corticosterona e mudanças na relação 5-HT/5-HIAA) em ratos submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado (do inglês, *chronic mild stress*) foram abolidos e revertidos, respectivamente, pelo tratamento crônico com UFP-101, de maneira semelhante à imipramina – droga antidepressiva de referência. Além disso, camundongos NOP^{-/-} apresentaram um perfil do tipo antidepressivo no teste do nado forçado e a administração central de UFP-101 10 nmol nesses animais foi ineficaz neste teste (Gavioli et al., 2003).

Atualmente, sabe-se ainda muito pouco sobre os efeitos do bloqueio dos receptores NOP com UFP-101 nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade. A grande maioria dos trabalhos tem utilizado o UFP-101 mais para investigar o papel do sistema N/OFQ-receptor NOP, do que para avaliar uma possível atividade *per se* nesses comportamentos. Nesse sentido, Vitale e colaboradores (2006) demonstraram que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 10 nmol (única dose testada) não promoveu nenhuma mudança significativa nos parâmetros comportamentais avaliados no LCE e no esconder defensivo condicionado (do inglês, *conditioned defensive burying tests*). Goeldner e colaboradores (2010) demonstraram que a infusão bilateral de UFP-101 1 e 3 nmol no hipocampo dorsal de camundongos não alterou as medidas de ansiedade no teste da caixa claro-escuro, apesar da análise visual desses resultados indicar um possível aumento no tempo no compartimento claro da caixa claro-escuro para a dose maior de UFP-101, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.

1.3. Labirinto em T elevado - modelo experimental de ansiedade

O labirinto em T elevado (LTE) foi desenvolvido para testar a hipótese de Deakin e Graeff (1991) sobre o papel dual da serotonina nos mecanismos de defesa. Esses pesquisadores, na tentativa de interpretar as evidências existentes do papel da serotonina na ansiedade propuseram que vias serotoninérgicas distintas com origem no núcleo dorsal da rafe (NDR) podem diferencialmente afetar a expressão de comportamentos defensivos associados ao transtorno de ansiedade generalizada e pânico. De acordo com essa hipótese, a ativação da via serotoninérgica ascendente que parte do NDR e que inerva a amígdala e o córtex frontal pode facilitar respostas defensivas a um perigo potencial ou distal, tais como comportamentos de esquiva inibitória e de avaliação de risco. Com base no efeito de drogas ansiolíticas, tais comportamentos têm sido relacionados em termos clínicos ao transtorno de ansiedade generalizada (Blanchard et al., 2003; Graeff, 2002). Por outro lado, a ativação da via periventricular que parte do NDR e que inerva a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) pode inibir as reações inatas de fuga ou luta em resposta a um perigo proximal, presumidamente relacionada ao transtorno do pânico (Blanchard et al., 2003; Graeff, 2002). Ou seja, de acordo com a hipótese de Deakin e Graeff (1991) a serotonina facilita a ansiedade, porém inibe o pânico.

O LTE possui três braços de dimensões iguais, elevados a 50 cm do chão, sendo que um dos braços é fechado por paredes laterais e é perpendicular aos outros dois braços abertos (Graeff et al., 1993). No LTE são avaliados dois comportamentos motivados aversivamente: a esquiva inibitória e a fuga, que são associados com o transtorno de ansiedade generalizada e com o transtorno de pânico, respectivamente. A esquiva inibitória corresponde ao tempo que o animal leva para deixar o braço fechado do LTE, sendo colocado dentro deste braço por três vezes consecutivas. A fuga, avaliada após as sessões de esquiva e também por três vezes consecutivas, corresponde ao tempo que o animal leva para sair de um dos braços abertos do LTE (Conde et al., 1999; Poltronieri et al., 2003; Teixeira et al., 2000; Viana et al., 1994; Zangrossi e Graeff, 1997).

Os resultados da validação farmacológica do LTE demonstraram que os fármacos relacionados à serotonina buspirona (agonista 5-HT_{1A}) e ritanserina (antagonista 5-HT_{2A/2C}), que na clínica melhoram os sintomas da ansiedade generalizada, prejudicaram a latência para sair do braço fechado (esquiva inibitória), mas não alteraram a latência para sair do braço aberto (fuga). Por outro lado, o tratamento crônico com os fármacos antidepressivos imipramina

(inibidor da recaptação de 5-HT e noradrenalina) e paroxetina (inibidor da recaptação de 5-HT), que exercem um efeito ansiolítico e panicolítico na clínica, prejudicaram a esquivia inibitória e prolongaram a fuga no LTE (para revisão ver Zangrossi et al., 2001; Beijamini e Andreatini, 2003).

Como visto anteriormente, fármacos com atividade antidepressiva, como os ISRS, são os fármacos de primeira escolha no tratamento de um amplo espectro dos transtornos de ansiedade (Baldwin et al., 2005). Em 2007, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada com duloxetine, um ISRSN, e os resultados sugerem que este fármaco deve ser uma das primeiras opções a ser considerada no tratamento deste transtorno psiquiátrico (Kornstein et al., 2009). Embora existam atualmente muitos tratamentos farmacológicos e psicoterapias disponíveis para o tratamento de pacientes com transtornos de ansiedade, os resultados clínicos estão longe dos ideais (Garner et al., 2009).

Assim, novas pesquisas continuam sendo necessárias para buscar compostos ansio-seletivos alternativos com menor potencial a induzir reações adversas (Fricchione, 2004). Nesse contexto, os neuropeptídeos surgem como alvos terapêuticos atrativos para o tratamento dos transtornos de ansiedade. Resultados pré-clínicos demonstraram que o tratamento agudo ou crônico com o antagonista peptídico competitivo NOP UFP-101 apresentou um efeito do tipo antidepressivo (Gavioli et al., 2003, 2004; Vitale et al., 2006). Entretanto, existem poucas evidências sobre os efeitos do bloqueio dos receptores NOP com UFP-101 nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade. Dessa forma, os efeitos da administração central com UFP-101 em diferentes testes de ansiedade, como o LTE, precisam ser melhor caracterizados.

Além disso, os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos da administração central de UFP-101, como o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico (os fármacos de primeira escolha no tratamento dos transtornos de ansiedade atuam/modulam esses sistemas) e a participação das peptidases endógenas também precisam ser investigados. Até o momento não existem estudos sobre o metabolismo do UFP-101. Além de formar metabólitos inativos, a ação das peptidases endógenas pode resultar na formação de metabólitos ativos com a mesma atividade farmacológica do peptídeo natural (Miwa et al., 2010; Sandin et al., 1999) ou ainda com atividade farmacológica distinta (De Araujo et al., 2001). A inibição da atividade de duas peptidases

endógenas, a aminopeptidase N e a endopeptidase 24.11, importantes no metabolismo da N/OFQ (Montiel et al., 1997; Noble e Roques, 1997; Sakurada et al., 2002), neuropeptídeo que apresenta uma seqüência de aminoácidos semelhante a do UFP-101, é uma maneira de avaliar a participação dessas enzimas nos efeitos comportamentais produzidos pela administração central de UFP-101, bem como dos fragmentos peptídicos gerados pela sua ação. A bestatina é um potente inibidor competitivo da enzima aminopeptidase N (uma ectopeptidase; Wang et al., 2010) e o fosforamidon da enzima endopeptidase 24.11 (Roques et al., 1993).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração central de UFP-101 no comportamento de ratos submetidos ao LTE e investigar os possíveis mecanismos responsáveis por esses efeitos.

2.2. Específicos:

1 – Avaliar o efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral no comportamento de ratos submetidos ao LTE;

2 – Avaliar a participação do receptor NOP no efeito comportamental produzido pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 no LTE, através do pré-tratamento com N/OFQ;

3 – Avaliar a influência dos inibidores de peptidase, bestatina e fosforamidon, no efeito comportamental produzido pela administração de UFP-101 no ventrículo lateral e avaliado no LTE;

4 – Avaliar o efeito da inibição da síntese de serotonina no efeito comportamental produzido pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 no LTE;

5 – Avaliar a participação do NDR, através da administração intra-núcleo de UFP-101, no comportamento de ratos submetidos ao LTE;

6 – Avaliar a participação do LC, através do registro da taxa de disparo dos neurônios noradrenérgicos, no efeito comportamental produzido pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 no teste de esconder esferas (TEE).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram empregados ratos machos das linhagens Wistar e Sprague-Dawley, pesando de 200 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e do Serviço de Experimentação e Produção Animal da Universidade de Cádiz (CA/ICS), respectivamente.

Os ratos Wistar foram alojados em grupos de 4 a 6 animais/caixa de polipropileno (42 x 34 x 17 cm). Essas caixas foram acomodadas em estantes ventiladas (Alesco Ind. e Com. Ltda, SP, Brasil), em uma sala (biotério setorial) do laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. A sala foi mantida a uma temperatura de 23 ± 2 °C e um ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7 h).

Os ratos Sprague-Dawley foram alojados em grupos de 4 animais/caixa de polipropileno ou macrolon transparente (21,50 x 46,50 x 14,50 cm) em uma sala (biotério setorial) do Departamento de Neurociências da Universidade de Cádiz (CA/5/U). Nessa sala, as condições ambientais de temperatura (22 ± 1 °C), umidade relativa ($55 \pm 10\%$) e ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas às 08:00 h) foram controladas automaticamente.

Os animais receberam água e comida “ad libitum”, exceto durante a vigência dos experimentos. Os experimentos que utilizaram ratos Wistar foram realizados entre 14 e 18 h, enquanto os experimentos com ratos Sprague-Dawley foram realizados entre 9 e 15 h.

Nos estudos comportamentais, os animais foram transferidos para uma sala com as mesmas condições de temperatura e iluminação que a sala do biotério setorial, no mínimo 1 h antes do início dos experimentos, para aclimação.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e com as normas estabelecidas no Real Decreto 1201/2005 sobre proteção dos animais utilizados para experimentação e outros fins (B.O.E. num. 252, Espanha). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA 23080.057218/2008-54/UFSC) e da Universidade de Cádiz. Foi utilizado o número mínimo de animais necessário para obtenção de dados confiáveis.

3.2. Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

4-cloro-DL-fenilalanina, PCPA, Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina com Tween-80 a 1%;

Cloridrato de quetamina, Francotar[®], Eurofarma Lab. Ltda, SP, Brasil);

Cloridrato de Xilazina, Anasedan[®], Vetbrands Saúde Animal, SP, Brasil);

Fosforamidon, sal dissódio N-(α -Ramnopiranosiloxihidroxifosfinil)-Leu-Trp ou sal dissódico N-(α -Ramnopiranosilfosfono)-L-leucil-L-triptofano), Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em PBS;

Cloridrato de Bestatina, N-[(2S,3R)-3-Amino-2-hidroxi-4-fenilbutiril]-L-leucina hidrocloreto, Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em PBS;

Cloridrato de Clonidina, 2-(2,6-Dicloroanilino)-2-imidazolina hidrocloreto, Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina;

Cloridrato de Fluoxetina, Prozac[®], Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA), Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina;

Cloridrato de Idazoxano, (\pm)-2-[1,4-Benzodioxan-2-yl]-2-imidazoline hydrochloride. Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina;

Cloridrato de Naloxona Diidratada, Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina;

Nociceptina/orfanina FQ, N/OFQ = Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln, sintetizada pelo Dr. R. Guerrini, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Università di Ferrara (Ferrara, Itália). Dissolvida em PBS;

PBS, *physiological buffer solution*, Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,0;

Sacarose, dissolvida em água destilada a 30 %;

Solução de cloreto de sódio a 0,9 %, salina;

Sulfato de Morfina Pentahidratado, Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, EUA). Dissolvido em salina;

UFP-101, [Nphe¹,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂, sintetizado por Dr. R. Guerrini, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Università di Ferrara (Ferrara, Itália). Dissolvido em PBS.

As drogas dissolvidas em salina foram administradas por via I.P. ou endovenosa. O volume de injeção foi de 1 ml/Kg de peso corporal, a exceção do tratamento com PCPA que foi de 5 ml/Kg de peso corporal. As drogas dissolvidas em PBS foram administradas no ventrículo lateral ou no NDR.

3.3. Cirurgias estereotáxicas

3.3.1. Implante de cânula-guia para administração de drogas no ventrículo lateral ou no NDR de ratos Wistar

Os animais foram anestesiados com xilazina (75 mg/Kg, I.P.) e quetamina (10 mg/Kg, I.P.). Depois de verificada a perda total dos reflexos, os animais foram imobilizados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA). Em seguida, foram feitas a tricotomia, a assepsia com álcool iodado e a injeção de cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo no momento da incisão) na parte posterior da cabeça de cada animal. Ao final, a calota craniana, após a raspagem do periósteo, foi exposta e perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e inserção de uma cânula-guia (15 mm de comprimento, DI = 0,22 mm e DE = 0,28 mm) 1 mm acima do ventrículo lateral (AP = -0,8, ML = ±1,5 e DV = -2,5 mm) ou 2 mm acima do NDR (AP = +1,2, ML = +2,9 e DV: -4,7 mm, angulação de 29°). As coordenadas do ventrículo lateral e do NDR foram tiradas em relação ao bregma e ao lambda, respectivamente, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986) para essas estruturas.

Feita para a fixação dos parafusos e implante da cânula-guia, a área aberta foi preenchida com acrílico auto-polimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Por fim, um mandril, do tamanho da cânula-guia, foi introduzido no interior da cânula-guia para evitar a oclusão da mesma.

Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa de polipropileno e aquecido com uma lâmpada incandescente de 60 W. Depois da recuperação total da anestesia, cada animal foi reconduzido a sua caixa, aonde permaneceu recebendo água e ração à vontade por 5 a 6 dias antes dos testes comportamentais.

3.3.2. Implante de cânula-guia para administração de drogas no ventrículo lateral e de um eletrodo para registrar *in vivo* a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/Kg, I.P., dose inicial). O hidrato de cloral foi utilizado como anestésico porque não promove alterações significativas na frequência de disparo dos neurônios do LC (Korf et al., 1974). Em seguida, foi feita uma incisão na altura do pescoço e o implante de: 1) uma cânula de polietileno (DI = 1,8 mm e DE = 2,5 mm, Portex[®], Gran Bretanha) na traquéia, para facilitar a respiração do animal durante o experimento; 2) uma cânula de polietileno (DI = 0,4 mm e DE = 0,8 mm, Portex[®], Gran Bretanha) na veia jugular, para administrar doses adicionais de anestésico, caso fosse necessário, e de outros fármacos; e 3) uma cânula de polietileno (DI = 0,4 mm e DE = 0,8 mm, Portex[®], Gran Bretanha) na artéria carótida, para monitorar a pressão arterial durante o experimento. Doses adicionais de anestésico foram administradas quando o animal respondia a um estímulo externo, *e.g.*, pressionar levemente a pata traseira com uma pinça. O intervalo de administração dessas doses adicionais variou entre os animais, mas aproximadamente eram injetados 0,1 a 0,2 ml a cada 30 – 45 min.

Após esses procedimentos, os animais foram imobilizados em um aparelho estereotáxico (900, David Kopf[®], USA) e uma cânula-guia foi inserida 1 mm acima do ventrículo lateral, conforme descrito anteriormente (item 3.3.1). Em seguida, a cabeça do animal foi orientada para baixo, até que a diferença de altura entre o bregma e o lambda fosse de 2 mm (ângulo de 15 ° em relação à linha horizontal). Um orifício de cerca de 3 mm de diâmetro foi feito no osso occipital, de acordo com as coordenadas estereotáxicas do LC direito (AP = -3,7 e ML = -1,1 mm). As membranas dura-máter e aracnóide foram perfuradas e deslocadas com cuidado, com uma agulha hipodérmica, para evitar o rompimento de vasos sanguíneos meníngeos. Com o auxílio de um microposicionador hidráulico de avance e precisão micrométrica (640, David Kopf[®], USA), o eletrodo de registro foi lentamente implantado no LC direito (DV = -5 a -7 mm). As coordenadas do ventrículo lateral e do LC foram tiradas em relação ao bregma e a linha interaural, respectivamente, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986) para essas estruturas.

Uma manta termoreguladora (HB101/2, Letica[®], Espanha) situada entre o animal e o aparelho estereotáxico foi utilizada para manter a temperatura corporal em 37 °C durante todo o experimento.

Os registros *in vivo* da atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC foram realizados na Universidad de Cádiz, Espanha, sob orientação do Prof. Juan Antonio Micó Segura, durante o estágio de doutorado *sandwich*.

3.4. Eletrodo de registro

Os eletrodos utilizados para captar a atividade elétrica extracelular de um único neurônio do LC foram fabricados a partir de micropipetas de vidro Omegadot com filamento interno (1,5 x 1,12 x 100 mm) em um estirador vertical automático de pipetas (PE-21, Narishige®, Japão). A forma e o comprimento da ponta do eletrodo foram moldados pela temperatura e pelo peso de um dos suportes da micropipeta. O interior dos eletrodos foi preenchido com uma solução de Pontamina Sky Blue 2% dissolvida em acetato sódico 0,5%. Com a ajuda de um microscópio (HM-LUX, Leica®, Alemanha, aumento de 40 vezes), a ponta do eletrodo foi rompida até obter uma ponta com 1 a 2 µm de diâmetro.

3.5. Sistema de registro da atividade elétrica dos neurônios do LC

O sistema de registro da atividade elétrica dos neurônios do LC era composto por um eletrodo de registro, dois amplificadores, um osciloscópio, um analisador de áudio, um conversor analógico/digital e um computador (Figura 2).

A atividade elétrica dos neurônios do LC foi captada por um eletrodo de registro e enviada, através de um fio de prata introduzido em seu interior, a um pré-amplificador. O pré-amplificador convertia o sinal elétrico de alta impedância em baixa impedância e o amplificava em 10 vezes (Ganho x 10). Esse sinal era enviado a outro amplificador (AC-DC Amplifier AE3, Cibertec®, Espanha), que reduzia ainda mais a impedância e o amplificava novamente em 10 vezes. Além disso, o amplificador descartava o componente contínuo do sinal elétrico filtrando os ruídos elétricos maiores que 1 KHz. Após ser amplificado e filtrado, o sinal elétrico foi enviado a um osciloscópio (HM 507, HAMEG®, Alemanha), a um analisador de áudio (Aumon 14, Cibertec®, Espanha) e a um conversor analógico/digital (Micro 1401, Cambridge Eletronic Designin-CED®, Gran Bretanha). Por fim, o conversor analógico/digital transformava o sinal analógico em digital, para que o programa Spike 2 (Cambridge Eletronic Designin-CED®, Gran Bretanha), instalado no computador, pudesse adquirir e armazenar os sinais elétricos do LC. O animal e o sistema de registro estavam

conectados a um fio terra separado da rede elétrica geral para evitar ruídos ou interferências elétricas.

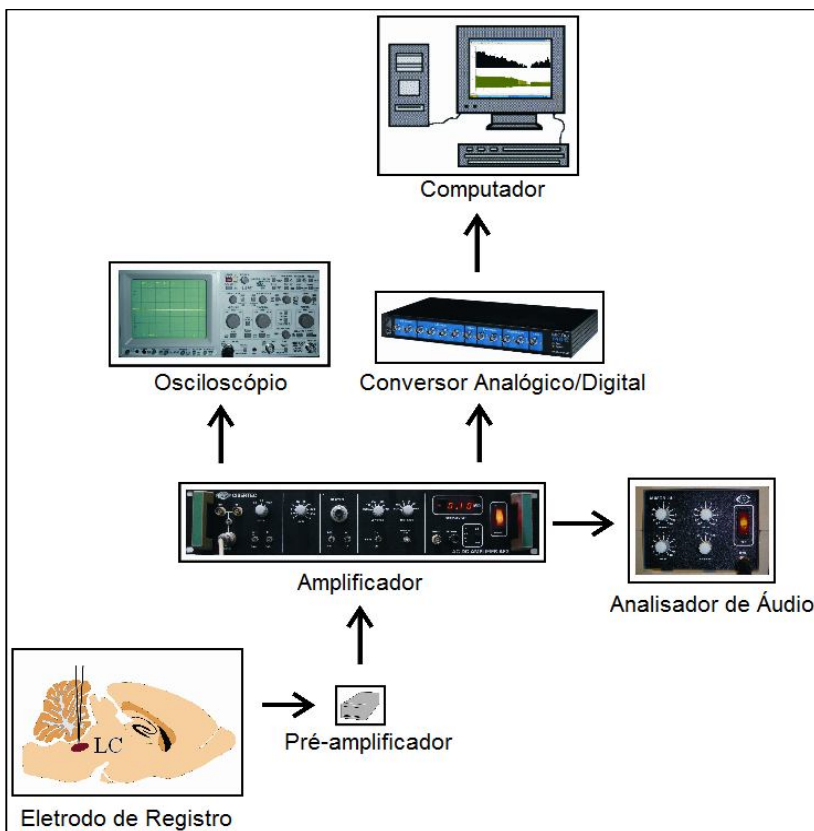


Figura 2 – Sistema de registro da atividade elétrica extracelular de um único neurônio do loco cerúleo (LC). O sinal elétrico foi captado pelo eletrodo de registro, amplificado, filtrado e convertido em um sinal digital. O osciloscópio e o analisador de áudio foram utilizados para monitorar o sinal elétrico. O computador armazenava os sinais captados para análises posteriores. Imagem cedida por Cristina Alba Delgado, Universidad de Cádiz, Espanha.

3.6. Localização e identificação dos neurônios do LC

Os neurônios do LC estão localizados logo abaixo do IV ventrículo, uma zona de relativo silêncio elétrico, e medial ao núcleo trigeminal mesencefálico (Me5, do inglês *mesencephalic trigeminal nucleus*), que pode ser ativado pela abertura passiva da mandíbula (Cedarbaum e Aghajanian, 1976).

Os neurônios do LC foram identificados através de critérios-padrão, previamente descritos por Cedarbaum e Aghajanian (1978) para ratos anestesiados, e são eles: descargas espontâneas com frequência entre 0,5 e 5 Hz, com predomínio entre 1 e 3 Hz; morfologia bifásica, uma parte inicial positiva e maior seguida de uma parte final negativa e menor; e duração de 2 a 6 ms. Além disso, os neurônios do LC direito respondem especificamente ao estímulo de compressão da pata contralateral traseira com várias descargas em salvas seguidas por um intervalo de silêncio eletrofisiológico (período quiescente; Korf et al., 1974).

3.7. Microinjeção intracerebral

Para a microinjeção intracerebral das drogas, os animais foram imobilizados com o auxílio de uma flanela, o mandril removido e uma agulha injetora foi inserida no interior da cânula-guia. O comprimento da agulha injetora para a administração no ventrículo lateral das drogas era de 16,5 mm, enquanto para a administração no NDR era de 17 mm. A agulha injetora estava conectada a uma micro-seringa (Hamilton[®], de 5 µl) por meio de um tubo de polietileno (PE-10). A micro-seringa estava acoplada a uma bomba de infusão (modelo B12000, Insight[®] Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), o que permitiu a administração automática do volume (ventrículo lateral = 0,3 - 2 µl; NDR = 0,3 µl) e da velocidade (ventrículo lateral = 0,6 - 4 µl/min; NDR = 0,6 µl/min) desejados. A agulha injetora foi mantida no interior da cânula-guia por um período adicional de 30 s para maximizar a difusão e evitar possível refluxo da droga.

3.8. Testes Comportamentais

3.8.1. Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado (LTE, Figura 3) é um modelo de ansiedade derivado do labirinto em cruz elevado, pela obstrução da entrada de um dos braços fechados (Graeff et al., 1993, 1998). O aparelho foi construído em madeira e possui três braços de dimensões iguais (50 x 10 cm), elevados a 50 cm do chão. O braço fechado do LTE é formado por paredes com 40 cm de altura, enquanto os braços abertos são circundados por uma borda de 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais do aparelho. Os braços abertos e o fechado são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A intensidade luminosa nos braços abertos do LTE foi de 50 lux.

No dia anterior ao experimento, ratos Wistar foram expostos individualmente a um dos braços abertos do LTE por 30 min. Os braços

abertos foram separados do braço fechado do LTE por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a plataforma central e o braço aberto. Passadas 24 h, cada animal foi tratado de acordo com o delineamento experimental (veja a seguir) e colocado no final do braço fechado do LTE, com a cabeça voltada para a plataforma central. O tempo necessário para sair com as quatro patas deste braço pela primeira vez foi registrado e adotado como Linha de Base.

Após deixar o braço fechado, cada animal explorou o aparelho por mais 10 s. Em seguida, duas novas medidas, com intervalos de 30 s, foram tomadas (Esquiva 1 e Esquiva 2). Após novamente 30 s, cada animal foi colocado no final do braço aberto (o mesmo ao qual havia sido exposto no dia anterior) e o tempo necessário para sair com as quatro patas deste braço foi registrado (Fuga 1). Em seguida, duas novas medidas (Fuga 2 e Fuga 3), com intervalos de 30 s, foram tomadas (adaptado de Teixeira et al., 2000). O aparelho foi limpo com solução de etanol a 10% após a avaliação completa de cada animal.

De maneira geral, fármacos com atividade do tipo ansiolítica diminuem a latência para sair do braço fechado do LTE, enquanto fármacos com atividade do tipo ansiogênica aumentam, quando comparado ao grupo controle. Além disso, fármacos com atividade do tipo panicolítica aumentam a latência para sair do braço aberto do LTE, enquanto fármacos com atividade do tipo panicogênica diminuem, quando comparado ao grupo controle (Graeff et al., 1998; Poltronieri et al., 2003).



Figura 3 – Labirinto em T elevado (LTE) do Laboratório de Neurofarmacologia da UFSC, utilizado neste estudo.

3.8.2. Campo aberto

A avaliação da atividade locomotora dos ratos Wistar foi realizada em um campo aberto (CA, Figura 4), que consistia de uma arena quadrada de polipropileno (100 x 100 cm), com paredes de 40 cm de altura e o piso dividido em 25 quadrados de 20 x 20 cm. A intensidade luminosa no centro do CA foi de 50 *lux*.

Após a avaliação no LTE, os ratos Wistar foram colocados individualmente no centro do CA e durante 5 min foram registrados o número de quadrados cruzados com as quatro patas e o número de comportamentos de levantar (*rearing*). Uma redução no número de cruzamentos e/ou de comportamentos de levantar, quando comparada ao grupo controle, pode ser interpretada como um prejuízo na atividade locomotora. Por outro lado, um aumento nesses parâmetros pode ser interpretado como uma melhora no desempenho motor (Prut e Belzung, 2003). O aparelho foi limpo com solução de etanol a 10% após a avaliação de cada animal.



Figura 4 – Campo aberto (CA) para avaliar a atividade locomotora espontânea de ratos Wistar do Laboratório de Neurofarmacologia da UFSC, utilizado neste estudo.

A avaliação da atividade locomotora dos ratos Sprague-Dawley foi realizada em um CA (Figura 5), que consistia de uma arena circular de polipropileno (D = 100 cm), com paredes de 50 cm de altura. A intensidade luminosa no centro do CA foi inferior a 15 *lux*. Os ratos Sprague-Dawley foram colocados individualmente no centro do CA e a distância total percorrida foi registrada durante 30 min com o auxílio de um programa de monitoramento de movimento (Smart; Panlab,

Barcelona, Espanha). Uma redução na distância total percorrida, quando comparada ao grupo controle, pode ser interpretada como um prejuízo na atividade locomotora. Enquanto um aumento nesse parâmetro pode ser interpretado como uma melhora no desempenho motor. O aparelho foi limpo com solução de etanol a 10% após a avaliação de cada animal.

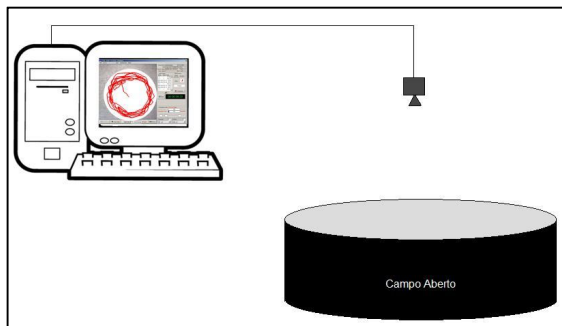


Figura 5 – Sistema de monitoramento da atividade locomotora espontânea de ratos Sprague-Dawley. Imagem do pesquisador.

3.8.3. Teste de esconder esferas

O teste de esconder esferas (TEE, Figura 6) foi realizado em uma caixa de macrolon transparente (21,50 x 46,50 x 14,50 cm), localizada no interior de uma sala com paredes escuras. Foram distribuídas uniformemente 16 esferas de vidros no piso da caixa, que estava coberto com serragem a 5 cm de altura. Sobre a caixa foram colocadas outra caixa de macrolon transparente, porém invertida para impedir a saída dos animais, e uma lâmpada incandescente de 100 W a 60 cm de altura. No dia do teste, os animais foram colocados individualmente no interior da caixa, próximo a uma das paredes, e o número de esferas cobertas com serragem, com mais de 2/3 de seu diâmetro, foi registrado durante 30 min (adaptado de Njung'e e Handley, 1991). De maneira geral, fármacos com atividade do tipo ansiolítica diminuem o número de esferas escondidas, enquanto fármacos com atividade do tipo ansiogênica aumentam o número de esferas escondidas, quando comparados aos animais do grupo controle (Nicolas et al., 2006; Njung'e e Handley, 1991; Thomas et al., 2009).



Figura 6 – Teste de esconder esferas (TEE). Imagem do pesquisador.

3.9. Delineamento Experimental

3.9.1. Experimento 1 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE

No experimento 1 (Figura 7), passados 5 ou 6 dias da cirurgia de implante de uma cânula-guia, para a administração de drogas no ventrículo lateral (para mais detalhes desse procedimento ver item 3.3.1), os animais foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE por 30 min. Depois de 24 h, os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS ou UFP-101 nas doses de 1, 3 ou 10 nmol. O volume de injeção foi de 2 μ l. Cinco minutos após o tratamento os animais foram submetidos à avaliação comportamental no LTE e, em seguida, avaliados no teste do CA.

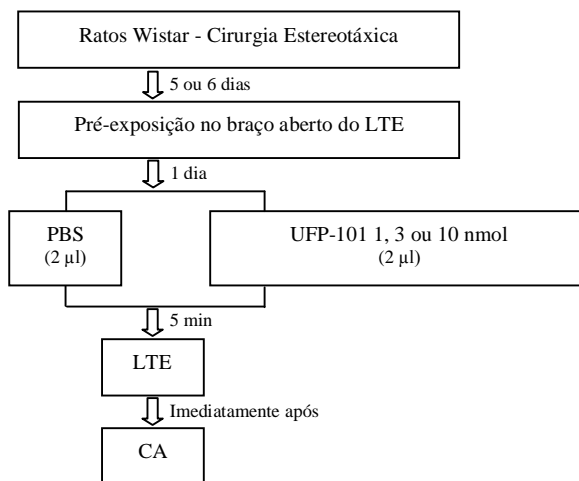


Figura 7 – Delineamento do Experimento 1.

3.9.2. Experimento 2 - Efeito da administração de N/OFQ no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE

No Experimento 2 (Figura 8) foi adotado o mesmo procedimento do Experimento 1, à exceção dos tratamentos. Os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS ou N/OFQ nas doses de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 ou 1 nmol. O volume de injeção foi de 2 μ l.

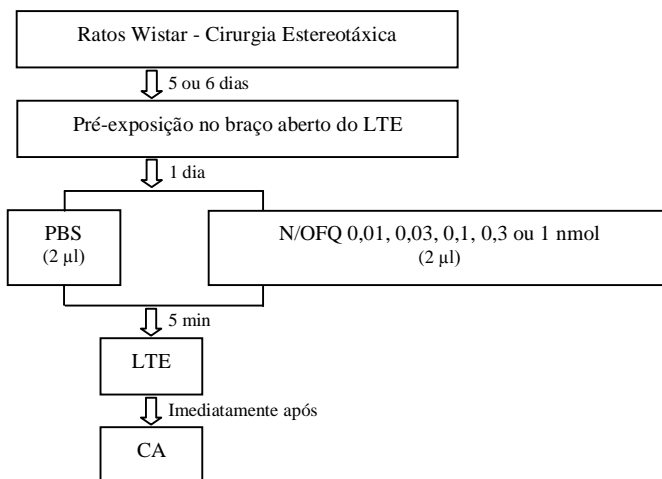


Figura 8 – Delineamento do Experimento 2.

3.9.3. Experimento 3 - Influência do pré-tratamento com N/OFQ no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

Novamente, no Experimento 3 (Figura 9) foi adotado o mesmo procedimento do Experimento 1, à exceção dos tratamentos e dos volumes injetados. Os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS+PBS, PBS+UFP-101 1 nmol, N/OFQ 0,3 nmol+PBS ou N/OFQ 0,3 nmol+UFP-101 1 nmol. O intervalo entre os tratamentos foi de 1 min e o volume em cada administração foi de 1 μ l.

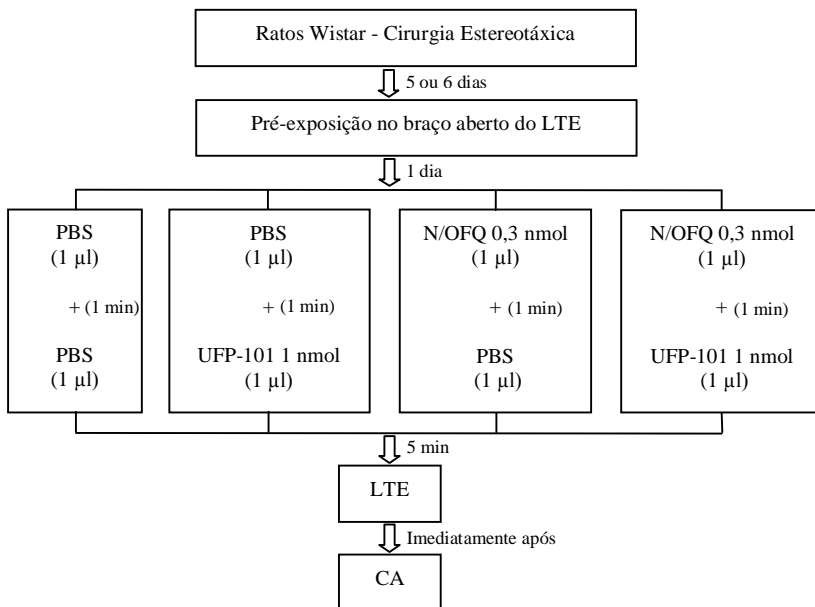


Figura 9 – Delineamento do Experimento 3.

3.9.4. Experimento 4 - Influência do pré-tratamento com bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

No Experimento 4 (Figura 10) também foi adotado o mesmo procedimento do Experimento 1, as exceções dos tratamentos e dos volumes injetados. Os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS+PBS, PBS+UFP-101 1 nmol, bestatina 2 nmol+PBS ou bestatina 2 nmol+UFP-101 1 nmol. O intervalo entre os tratamentos foi de 5 min e o volume em cada administração foi de 1 µl.

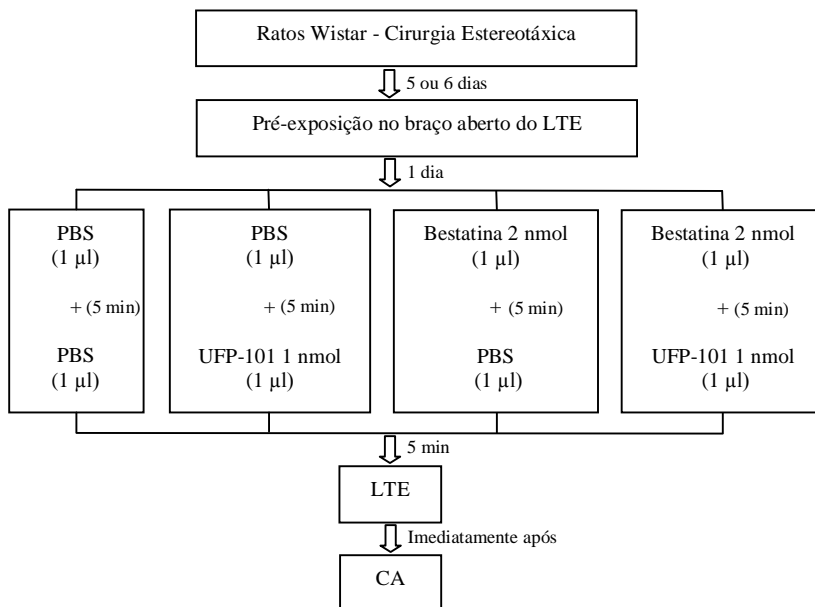


Figura 10 – Delineamento do Experimento 4.

3.9.5. Experimento 5 - Influência do pré-tratamento com fosforamidon no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

Na Figura 11 pode ser observado um esboço do Experimento 5, que as exceções dos tratamentos e dos volumes injetados, adotou o mesmo procedimento do Experimento 1. Os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS+PBS, PBS+UFP-101 1 nmol, fosforamidon 2 pmol+PBS ou fosforamidon 2 pmol+UFP-101 1 nmol. O intervalo entre os tratamentos foi de 25 min e o volume em cada administração foi de 1 µl.

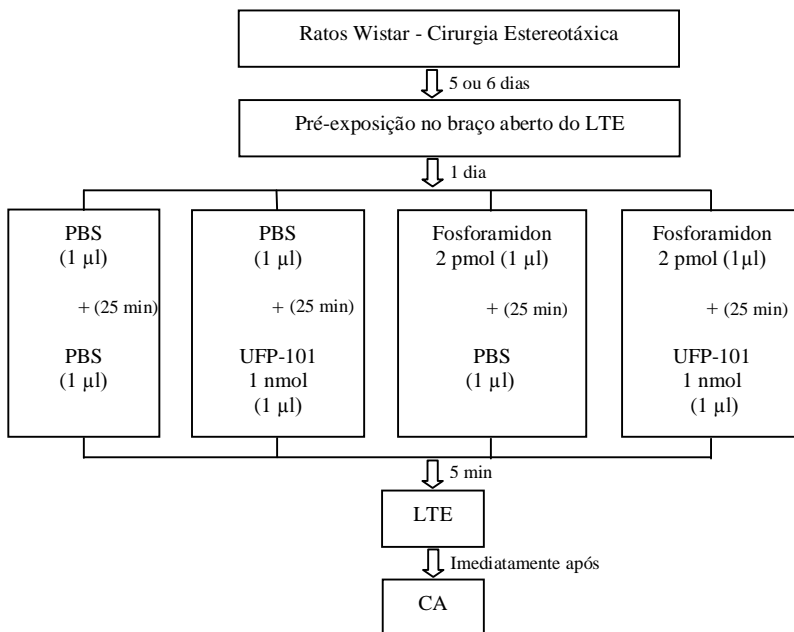


Figura 11 – Delineamento do Experimento 5.

3.9.6. Experimento 6 - Influência do pré-tratamento com fosforamidon e bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

No Experimento 6 (Figura 12) foi adotado o mesmo procedimento do Experimento 1, as exceções dos tratamentos e dos volumes injetados. Os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS+PBS+PBS, PBS+PBS+UFP-101 1 nmol, fosforamidon 2 pmol+bestatina 2 nmol+PBS ou fosforamidon 2 pmol+bestatina 2 nmol+UFP-101 1 nmol. O intervalo entre o primeiro e o segundo tratamento foi de 20 min, enquanto o intervalo entre o segundo e o terceiro tratamento foi de 5 min. Em cada injeção o volume administrado foi de 1 µl.

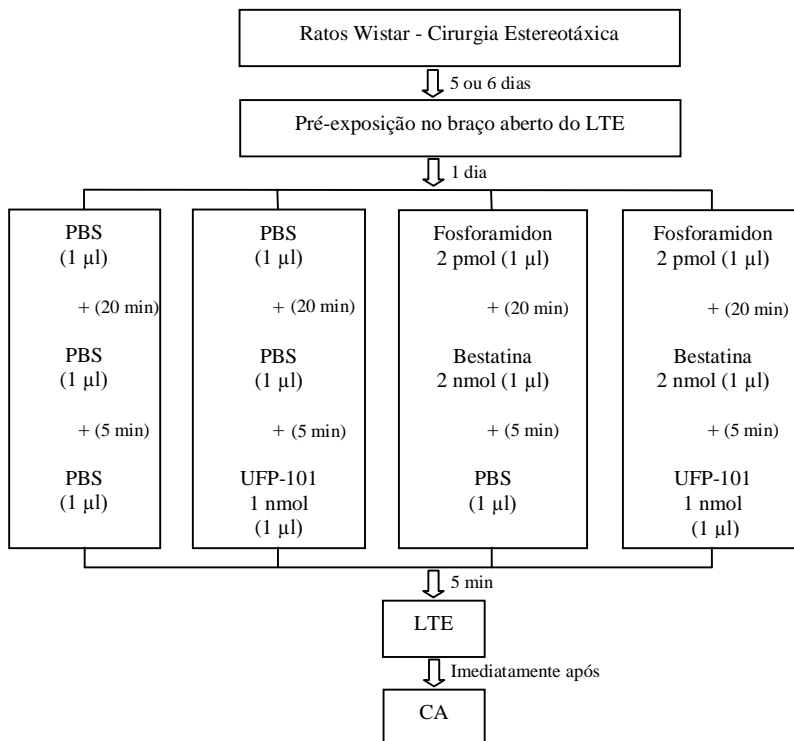


Figura 12 – Delineamento do Experimento 6.

3.9.7. Experimento 7 - Influência do pré-tratamento com PCPA no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral em ratos Wistar avaliados no LTE

Antes de começar o Experimento 7, foi realizada uma curva dose-resposta para fluoxetina no LTE. A partir desses resultados, a dose de fluoxetina selecionada para o Experimento 7 foi de 20 mg/Kg. Para isso, ratos Wistar foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE por 30 min. No dia seguinte, os animais foram tratados intraperitonealmente com solução salina (NaCl 0,9%) ou fluoxetina nas doses de 10, 15 ou 20 mg/Kg e depois de 30 min foram avaliados no LTE. Imediatamente após saírem do LTE, os animais foram avaliados no CA por 5 min.

No Experimento 7 (Figura 13), ratos Wistar foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, sendo que um grupo foi submetido a uma cirurgia estereotáxica, para a administração de drogas

no ventrículo lateral (para mais detalhes desse procedimento ver item 3.3.1). Os animais do grupo operado, após três dias, foram tratados intraperitonealmente com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg) por 4 dias seguidos (Gavioli et al., 2004). Os outros grupos foram tratados pela mesma via e tempo com veículo ou PCPA. No sexto dia todos os animais foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE. Sendo que, o quarto tratamento com veículo ou PCPA ocorreu 2 horas após a pré-exposição no LTE. No sétimo dia, o grupo de animais não operados e pré-tratados com veículo foi tratado por via intraperitoneal com salina e submetido depois de 30 min ao LTE. O grupo de animais não operados e pré-tratados com PCPA foi tratado por via intraperitoneal com salina ou fluoxetina 20 mg/Kg e avaliado depois de 30 min no LTE. Por fim, o grupo de animais operados e pré-tratados com PCPA foi tratado no ventrículo lateral com UFP-101 1 nmol e avaliado depois de 30 min no LTE. Todos os animais foram submetidos ao CA imediatamente após saírem do LTE.

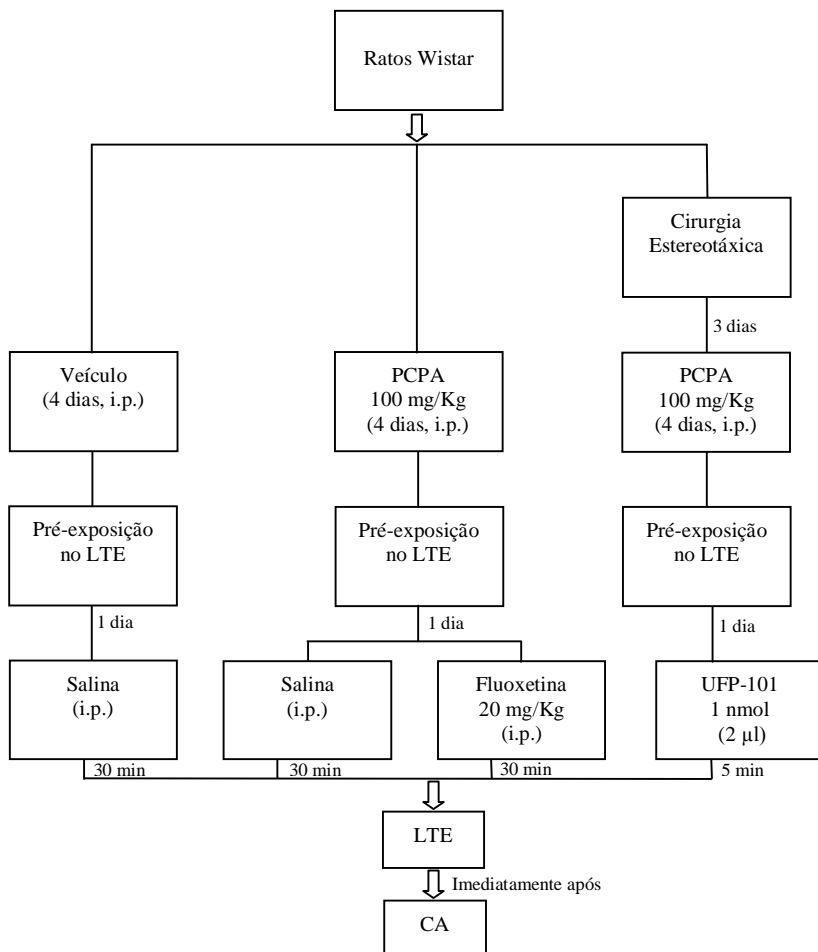


Figura 13 – Delineamento do Experimento 7.

3.9.8. Experimento 8 - Efeito da administração de UFP-101 no NDR de ratos Wistar submetidos ao LTE

No Experimento 8 (Figura 14), passados 5 ou 6 dias da cirurgia de implante de uma cânula-guia, para a administração de drogas no NDR (para mais detalhes desse procedimento ver item 3.3.1), os animais foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE por 30 min. Depois de 24 h, os animais foram tratados no NDR com PBS ou UFP-101 nas doses de 1, 3 ou 10 pmol. O volume de injeção foi de 0,3 µl. Cinco

minutos após o tratamento os animais foram submetidos à avaliação comportamental no LTE e, imediatamente após, no CA.

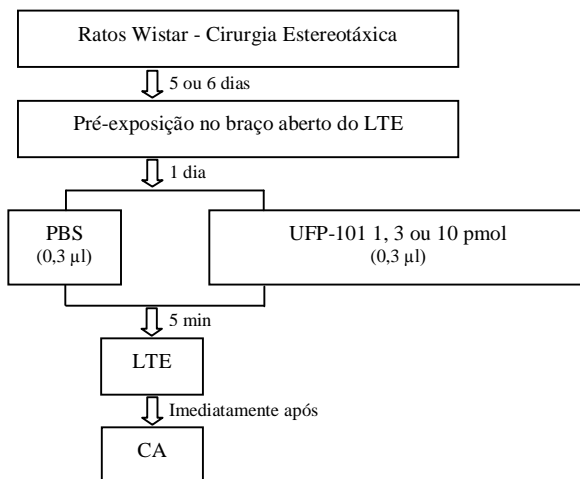


Figura 14 – Delineamento do Experimento 8.

3.9.9. Experimento 9 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley submetidos ao TEE e ao CA

No Experimento 9 (Figura 15), sete dias após a cirurgia de implante de uma cânula-guia, para a administração de drogas no ventrículo lateral, os animais foram tratados com PBS ou UFP-101 nas doses de 0,1, 0,3, 1 ou 3 nmol. O volume injetado no ventrículo lateral foi de 2 µl. Cinco minutos após o tratamento, uma parte dos animais foi submetida à avaliação comportamental no TEE por 30 min, enquanto a outra parte foi avaliada no CA durante 30 min.

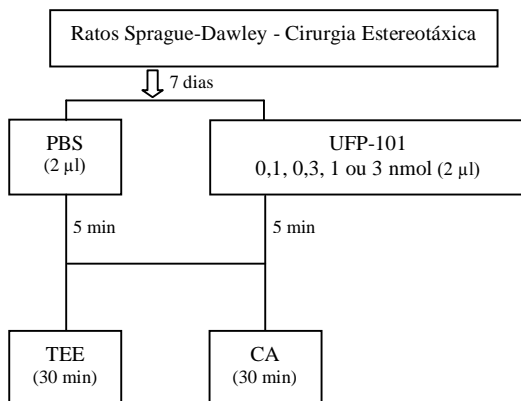


Figura 15 – Delineamento do Experimento 9.

3.9.10. Experimento 10 - Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley

Antes de começar o Experimento 10, foi realizada a padronização do teste de registro dos potenciais de ação dos neurônios do LC com a administração endovenosa de clonidina e morfina. Para isso, ratos Sprague-Dawley foram anestesiados e uma cânula de polietileno foi implantada na traquéia, jugular e carótida. Em seguida, um eletrodo de registro foi inserido no LC (para mais detalhes desses procedimentos ver item 3.3.2). Por fim, os animais foram divididos em 2 grupos: um grupo foi tratado com clonidina (0,3125 – 20 µg/Kg; agonista do receptor α_2 adrenérgico) e idazoxano (100 µg/Kg; antagonista do receptor α_2 adrenérgico); e outro com morfina (150 – 4800 µg/Kg; agonista do receptor MOP opióide) e naloxona (1000 µg/Kg; antagonista não-seletivo dos receptores opióides). Os tratamentos ocorreram em doses crescentes e cumulativas. Sendo que o intervalo entre as injeções de clonidina foi de 1 min, enquanto o intervalo entre as injeções de morfina foi de 2 min. Na faixa de doses utilizada, clonidina e morfina reduzem progressivamente até a inibição total da taxa de disparo dos neurônios do LC. O idazoxano e a naloxona bloqueiam os efeitos promovidos pela clonidina e pela morfina, respectivamente.

No Experimento 10 (Figura 16), o procedimento adotado foi semelhante à padronização do teste de registro dos potenciais de ação dos neurônios do LC, à exceção da via de administração, do tratamento e do intervalo entre as injeções. Para isso, além das cânulas de

polietileno inseridas na traquéia, jugular e carótida e do eletrodo de registro no LC, uma cânula-guia foi implantada para a administração no ventrículo lateral de UFP-101. O UFP-101 foi injetado, de forma cumulativa, nas doses de 0,3 e 1 nmol. O intervalo entre as injeções de UFP-101 foi de 6 min. O monitoramento da taxa de disparo dos neurônios do LC e da pressão arterial começou após o implante da cânula na carótida e do eletrodo de registro no LC.

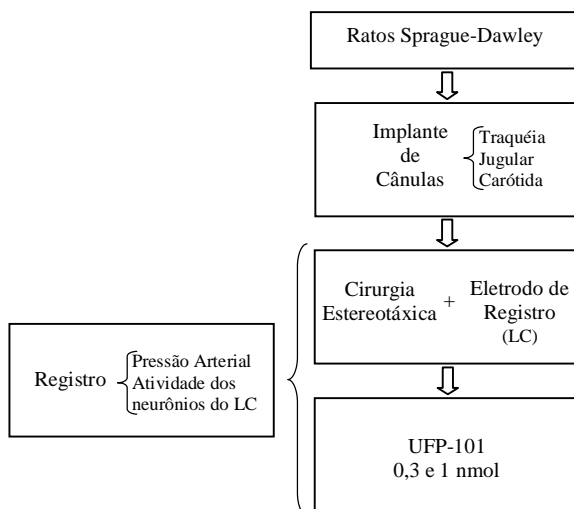


Figura 16 – Delineamento do Experimento 10.

3.9.11. Experimento 11 - Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley no TEE e no CA

No Experimento 11 (Figura 17), sete dias após a cirurgia de implante de uma cânula-guia, para a administração de drogas no ventrículo lateral, os animais foram tratados intraperitonealmente com salina ou naloxona 1 mg/Kg. Depois de 25 min os animais foram tratados no ventrículo lateral com PBS ou UFP-101 0,3 nmol. O volume injetado no ventrículo lateral foi de 2 μ l. Cinco minutos após o último tratamento, uma parte dos animais foi submetida à avaliação comportamental no TEE por 30 min, enquanto a outra parte foi avaliada no CA durante 30 min.

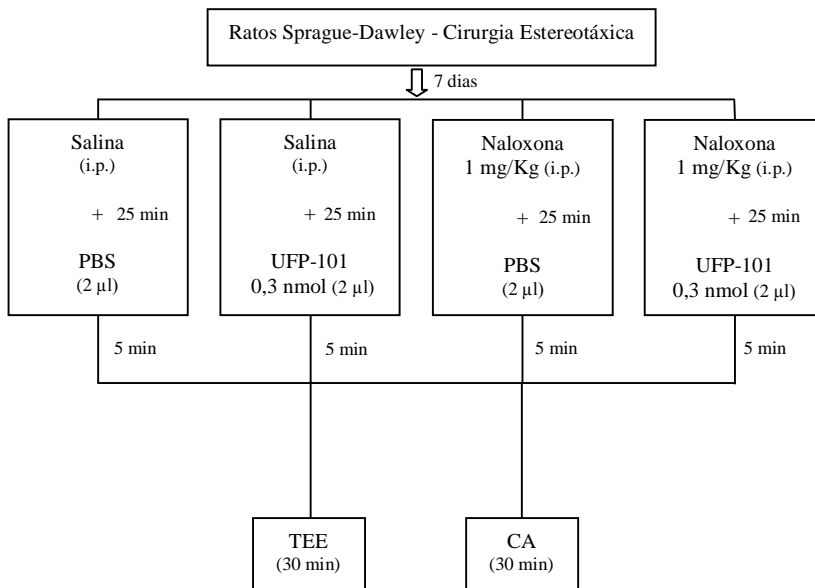


Figura 17 – Delineamento do Experimento 11.

3.9.12. Experimento 12 – Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC

No Experimento 12 (Figura 18), uma cânula de polietileno foi implantada na traquéia, jugular e carótida de ratos Sprague-Dawley. Além disso, uma cânula-guia foi implantada para a administração de UFP-101 no ventrículo lateral e um eletrodo de registro foi inserido no LC (para mais detalhes desses procedimentos ver item 3.3.2). Em seguida, os animais foram tratados por via endovenosa com naloxona 1 mg/Kg e passados 10 min foram tratados no ventrículo lateral com UFP-101 0,3 e 1 nmol. As doses de UFP-101 foram cumulativas e o intervalo entre as injeções foi de 6 min. O monitoramento da taxa de disparo dos neurônios do LC e da pressão arterial começou após o implante da cânula na carótida e do eletrodo de registro no LC.

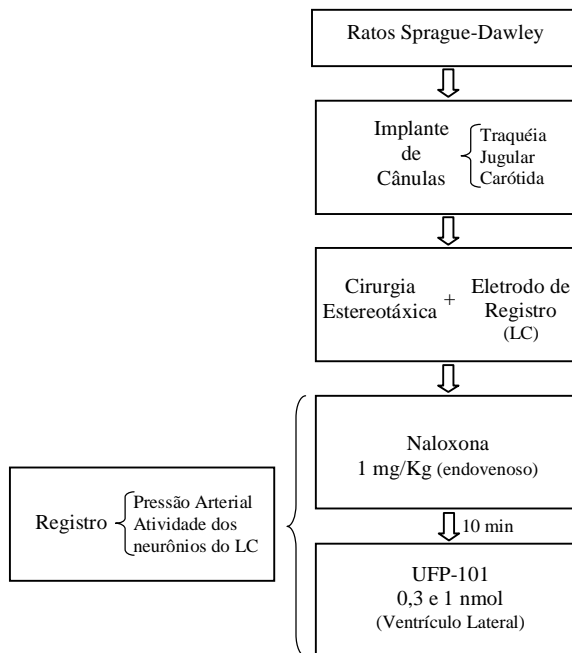


Figura 18 – Delineamento do Experimento 12.

3.10. Histologia

3.10.1. Verificação dos sítios de injeção

Para verificar a localização dos sítios de injeção os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/Kg, i.p.) e perfundidos intracardiacamente com 350 ml de salina (NaCl a 0,9%), seguida de 350 ml de formaldeído a 4%. Na sequência, os animais foram decapitados e uma solução de corante azul de Evans a 1% foi injetada no ventrículo lateral (2 µl) ou no NDR (0,3 µl). Os cérebros foram removidos e fixados em formol a 4% durante 3 dias.

Os cérebros dos animais com o sítio de injeção no ventrículo lateral foram cortados com um bisturi, a partir do orifício deixado pela cânula-guia, e o sítio de injeção foi verificado a olho nu. Os cérebros dos animais com o sítio de injeção no NDR foram transferidos para um recipiente com sacarose a 30% para crioproteção. Depois de 24 h, os cérebros foram cortados em um criostato (Leica CM1850) em seções coronais de 60 µm. Os cortes foram analisados no microscópio óptico e o sítio de microinjeção delimitado pelo azul de Evans foi verificado.

Foram excluídos da análise estatística dos dados os animais que não apresentavam a ponta da agulha injetora no ventrículo lateral (< 5%) ou no NDR (cerca de 35%).

3.10.2. Marcação da área de registro e verificação histológica

Ao final dos experimentos uma corrente catódica constante de 5 μ A (FICTE 10, Cibertec[®], Espanha) foi aplicada, através dos eletrodos de registro, por 10 min para marcar o sítio de registro com azul [a cor da solução de Pontamina Sky Blue (Lodge et al., 1974)]. Em seguida, os animais foram perfundidos intracardiacamente com 350 ml de salina (NaCl a 0,9%) e 350 ml de formaldeído a 4%. Os cérebros foram removidos, armazenados em formaldeído a 4% e mantidos a 4 °C até o momento da verificação histológica. Após esse período, os cérebros foram cortados em um criostato (Leica CM1850) em seções coronais de 30 - 50 μ m. Os cortes coronais foram fixados com Vermelho Neutro ou Fucsina Básica e a localização da marca azul deixada pela solução de Pontamina Sky Blue foi examinada microscopicamente. Os animais que não apresentavam os eletrodos de registro no LC foram excluídos da análise estatística dos dados (100% de acerto).

3.11. Análise Estatística

Todos os resultados obtidos no LTE, CA e TEE foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Quando o teste de Levene mostrou significância, os resultados foram transformados em \log_{10} , antes de serem submetidos à análise estatística.

Os resultados das latências para sair dos braços fechado (Esquiva) e aberto (Fuga) do LTE foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. O tratamento foi adotado como variável independente e as tentativas (Linha de Base, Esquiva 1-2 ou Fuga 1-3) como medidas repetidas. Os resultados do CA (número de cruzamentos, número de levantar e distância total percorrida) e do TEE foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido, quando apropriado, pela realização de comparações múltiplas com o teste *post-hoc* de Duncan. Todos os resultados do LTE, do CA e do TEE são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

A inibição na taxa de disparo dos neurônios do LC, promovida pela administração endovenosa de clonidina ou de morfina, foi expressa como porcentagem da taxa basal de disparos (definida como 100%), sendo que, a taxa basal de disparos foi considerada como a média da frequência de disparos registrada durante 100 s antes do início dos

tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de regressão não-linear, ajustados ao modelo de regressão não-linear logístico proposto por Parker e Waud (1971): $E = E_{\text{máx}}/[1 + (DE_{50}/A)^n]$, onde: E é a mudança na taxa de disparo dos neurônios do LC promovida por A ; $E_{\text{máx}}$ é a máxima mudança de porcentagem na taxa de disparo dos neurônios do LC; DE_{50} é a dose de A que promove 50% da $E_{\text{máx}}$; A é a dose de clonidina ou morfina usadas por via endovenosa; e n é o fator inclinação da curva dose-resposta.

As análises estatísticas dos resultados obtidos no LTE, CA e TEE foram realizadas no programa Statistic[®] versão 6.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, EUA). Os gráficos foram construídos pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, EUA), que também foi utilizado para analisar os resultados da taxa de disparo dos neurônios do LC. O nível de significância adotado foi de $P < 0.05$.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

4.1. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE

Como pode ser observado na Figura 19A, a administração central de UFP-101 reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado do LTE. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 10,29$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,58) = 51,48$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 4,31$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que a latência para sair do braço fechado dos animais tratados com UFP-101 foi significativamente menor nas Esquivas 1 (UFP-101 1, 3 e 10 nmol) e 2 (UFP-101 1 e 3 nmol) quando comparada ao grupo PBS.

Por outro lado, a latência para sair do braço aberto do LTE não foi afetada por nenhum fator (Figura 19B). A ANOVA para medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 0,95$; NS], do fator repetição [$F(2,58) = 0,10$; NS], e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 0,58$; NS].

No teste do CA, a ANOVA de uma via mostrou que o número de cruzamentos [$F(3,29) = 3,63$, $P < 0,05$] e de comportamentos de levantar [$F(3,29) = 3,53$, $P < 0,05$] foram afetados pelo tratamento. Entretanto, a análise *post-hoc* não revelou diferença significativa entre os animais tratados com UFP-101 e os tratados com PBS (Tabela 3). A análise *post-hoc* mostrou somente uma tendência de aumento no número de cruzamentos ($P = 0,07$) e de comportamentos de levantar ($P = 0,08$) entre os animais tratados com UFP-101 1 nmol e os tratados com PBS.

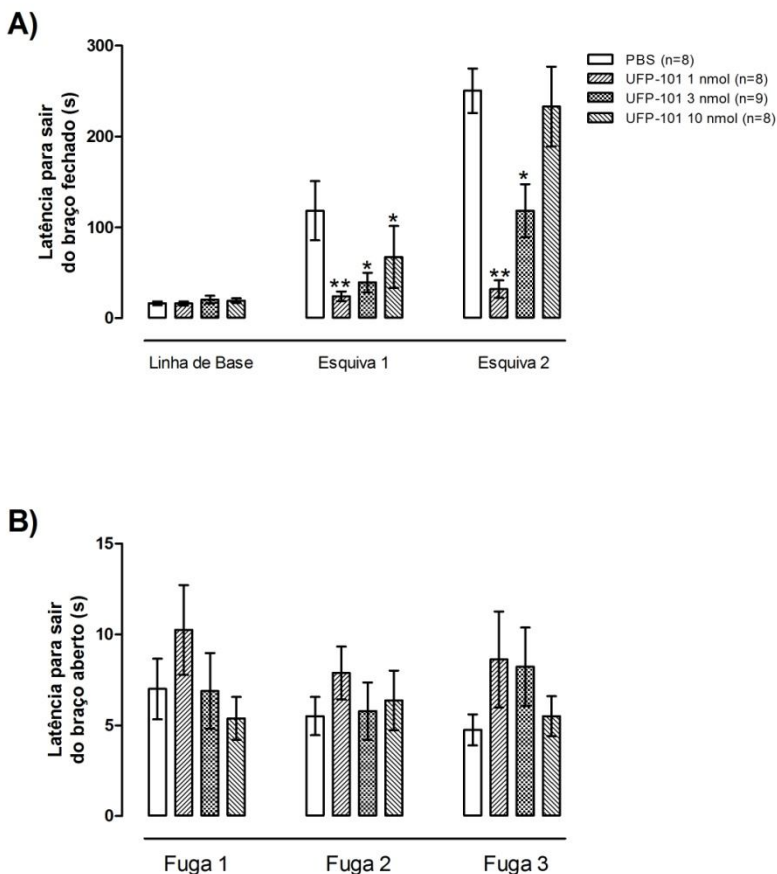


Figura 19 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. PBS na mesma Esquiva (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 3 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de cruzamentos e de comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (nmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS	8	64,38 \pm 10,48	12,86 \pm 1,79
UFP-101 (1)	8	91,13 \pm 14,52	18,25 \pm 2,68
UFP-101 (3)	9	53,67 \pm 5,56	15,44 \pm 1,81
UFP-101 (10)	8	46,88 \pm 8,74	9,12 \pm 1,85

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes.

4.2. Efeito da administração de N/OFQ no ventrículo lateral de ratos Wistar submetidos ao LTE

O tratamento central com N/OFQ reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado do LTE (Figura 20A). A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(4,37) = 13,48$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,74) = 36,86$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(8,74) = 2,85$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com N/OFQ reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado nas Esquivas 1 (N/OFQ 0,01 e 0,1 nmol) e 2 (N/OFQ 0,01, 0,03 e 0,1 nmol) quando comparada ao tratamento com PBS.

Na latência para sair do braço aberto do LTE (Figura 20B), a ANOVA para medidas repetidas mostrou um efeito significativo do fator repetição [$F(2,74) = 3,20$; $P < 0,05$], porém não revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(4,37) = 0,29$; NS] ou da interação entre os fatores [$F(8,74) = 0,66$; NS].

Em relação ao teste do CA, a ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo do tratamento no número de cruzamentos [$F(4,37) = 1,11$; NS]. Entretanto, um efeito significativo do tratamento foi encontrado no número de levantar [$F(4,37) = 2,76$; $P < 0,05$]. A análise *post-hoc* demonstrou que a administração no ventrículo lateral de N/OFQ 0,03 nmol aumentou o número de comportamentos de levantar quando comparado ao grupo PBS (Tabela 4).

Todos os animais tratados com N/OFQ 1 nmol permaneceram 300 s na Linha de Base e, por esse motivo, as medidas de Esquiva 1 e 2 não foram realizadas. Entretanto, as medidas de latência para sair do braço aberto do LTE e do número de cruzamentos e comportamentos de

levantar foram realizadas, mas nenhum efeito significativo do tratamento com N/OFQ 1 nmol foi encontrado (dados não apresentados).

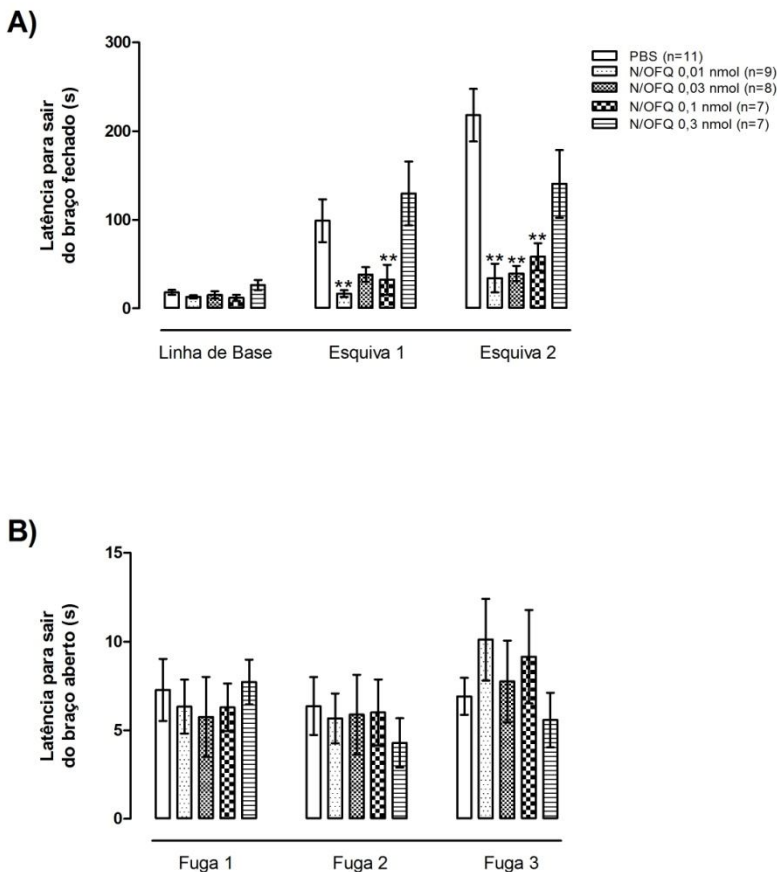


Figura 20 – Efeito da administração de N/OFQ (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquinas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. ** $P < 0,01$ vs. PBS na mesma Esquina (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 4 – Efeito da administração de N/OFQ (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (nmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS	11	53,00 \pm 7,12	11,54 \pm 1,56
N/OFQ (0,01)	9	70,56 \pm 12,87	13,56 \pm 2,35
N/OFQ (0,03)	8	78,75 \pm 13,12	19,25 \pm 1,52*
N/OFQ (0,1)	7	53,86 \pm 12,83	11,86 \pm 2,61
N/OFQ (0,3)	7	56,86 \pm 8,28	12,14 \pm 1,10

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. * $P < 0,05$ vs. PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

4.3. Influência do pré-tratamento com N/OFQ no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

A influência do pré-tratamento com N/OFQ 0,3 nmol no efeito da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral sobre a latência para sair do braço fechado do LTE é ilustrado na Figura 21A. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,32) = 10,02$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,64) = 64,12$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,64) = 4,38$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com PBS+UFP-101 1 nmol reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado nas Esquivas 1 e 2 quando comparada aos tratamento com PBS+PBS, N/OFQ 0,3 nmol+PBS e N/OFQ 0,3 nmol+UFP-101 1 nmol.

Por outro lado, a latência para sair do braço aberto do LTE não foi afetada por nenhum fator (Figura 21B). A ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,32) = 1,02$; NS], do fator repetição [$F(2,64) = 0,84$; NS], e da interação entre os fatores [$F(6,64) = 0,30$; NS].

Como descrito na Tabela 5, a ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos no número de cruzamentos [$F(3,32) = 0,79$; NS] e comportamentos de levantar [$F(3,32) = 0,33$; NS] avaliados no teste do CA.

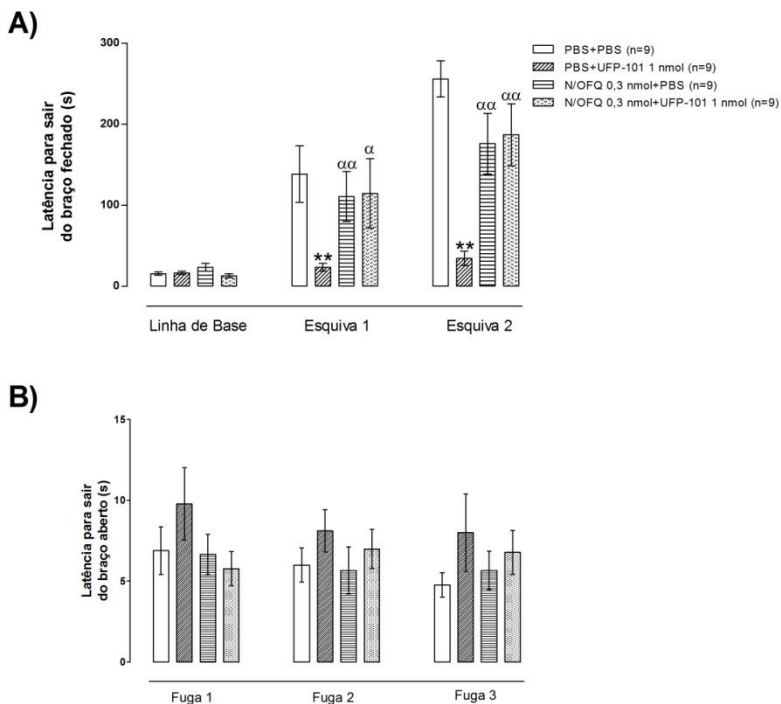


Figura 21 – Influência do pré-tratamento com N/OFQ (0,3 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. A N/OFQ foi administrada no ventrículo lateral 1 min antes da administração de UFP-101. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o último tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. PBS+PBS e $^{\alpha}$ $P < 0,05$ vs. PBS+UFP-101 1 nmol na mesma Esquiva (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 5 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (nmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS+PBS	9	65,56 \pm 9,32	13,22 \pm 1,54
PBS+UFP-101 (1)	9	84,78 \pm 14,30	16,67 \pm 2,85
N/OFQ (0,3)+PBS	9	63,67 \pm 10,40	12,11 \pm 0,84
N/OFQ (0,3)+UFP-101 (1)	9	75,33 \pm 9,17	12,56 \pm 1,59

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes.

4.4. Influência do pré-tratamento com bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

A Figura 22A ilustra a influência do pré-tratamento com bestatina 2 nmol no efeito da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral sobre a latência para sair do braço fechado do LTE. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 6,74$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,58) = 62,21$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 3,32$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com PBS+UFP-101 1 nmol reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado na Esquiva 1 quando comparada ao tratamento com bestatina 2 nmol+PBS e na Esquiva 2 em relação ao tratamento com PBS+PBS, bestatina 2 nmol+PBS e bestatina 2 nmol+UFP-101 1 nmol.

Nenhum fator alterou a latência para sair do braço aberto do LTE (Figura 22B). A ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 1,27$; NS], do fator repetição [$F(2,58) = 1,27$; NS], e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 0,61$; NS].

No teste do CA (Tabela 6), a ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo dos tratamentos no número de cruzamentos [$F(3,29) = 1,77$; NS] e comportamentos de levantar [$F(3,29) = 1,99$; NS].

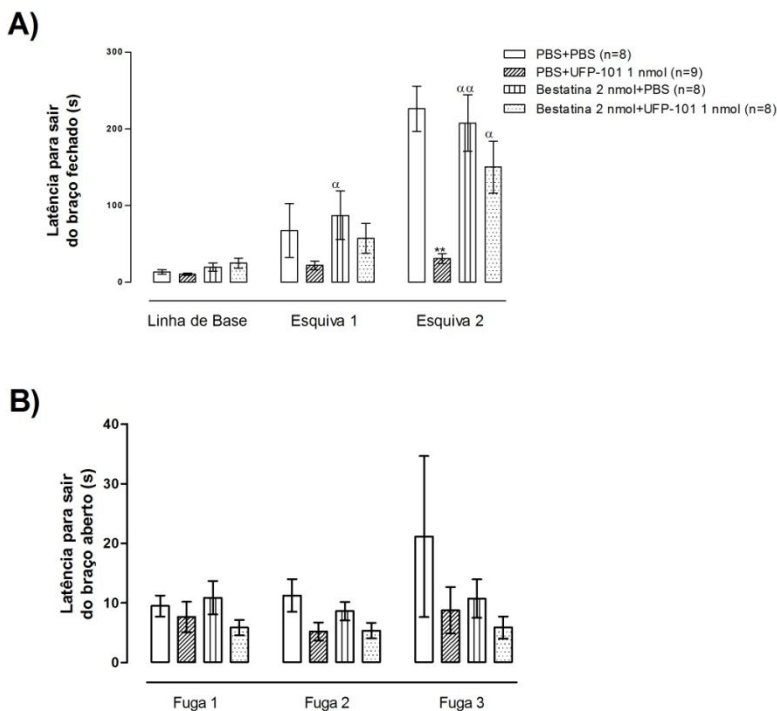


Figura 22 – Influência do pré-tratamento com bestatina (2 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral nas latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. A bestatina foi administrada no ventrículo lateral 5 min antes da administração de UFP-101. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o último tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. $^{**}P < 0,01$ vs. PBS+PBS e $^{\alpha}P < 0,05$, $^{\alpha\alpha}P < 0,01$ vs. PBS+UFP-101 1 nmol na mesma Esquiva (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 6 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (nmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS+PBS	8	57,38 \pm 12,74	8,63 \pm 2,32
PBS+UFP-101 (1)	9	81,89 \pm 8,82	17,11 \pm 1,42
Bestatina (2)+PBS	8	73,25 \pm 6,64	13,38 \pm 4,17
Bestatina (2)+UFP-101 (1)	8	87,13 \pm 9,71	12,00 \pm 1,34

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes.

4.5. Influência do pré-tratamento com fosforamidon no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

Na Figura 23A pode ser observada a influência do pré-tratamento com fosforamidon 2 pmol no efeito da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral sobre a latência para sair do braço fechado do LTE. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,28) = 6,02$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,56) = 22,08$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,56) = 3,561$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que a latência para sair do braço fechado foi significativamente menor nos animais tratados com PBS+UFP-101 1 nmol e fosforamidon 2 pmol+UFP-101 1 nmol na Esquiva 1 quando comparada ao grupo PBS+PBS e na Esquiva 2 em relação aos grupos PBS+PBS e fosforamidon 2 pmol+PBS.

Como pode ser observado na Figura 23B, nenhum fator afetou significativamente a latência para sair do braço aberto do LTE. A ANOVA para medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do fator tratamento [$F(3,28) = 1,43$; NS], do fator repetição [$F(2,56) = 1,22$; NS], e da interação entre os fatores [$F(6,56) = 0,46$; NS].

A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos no número de cruzamentos [$F(3,28) = 2,33$; NS] e comportamentos de levantar [$F(3,28) = 0,51$; NS] avaliados no teste do CA (Tabela 7).

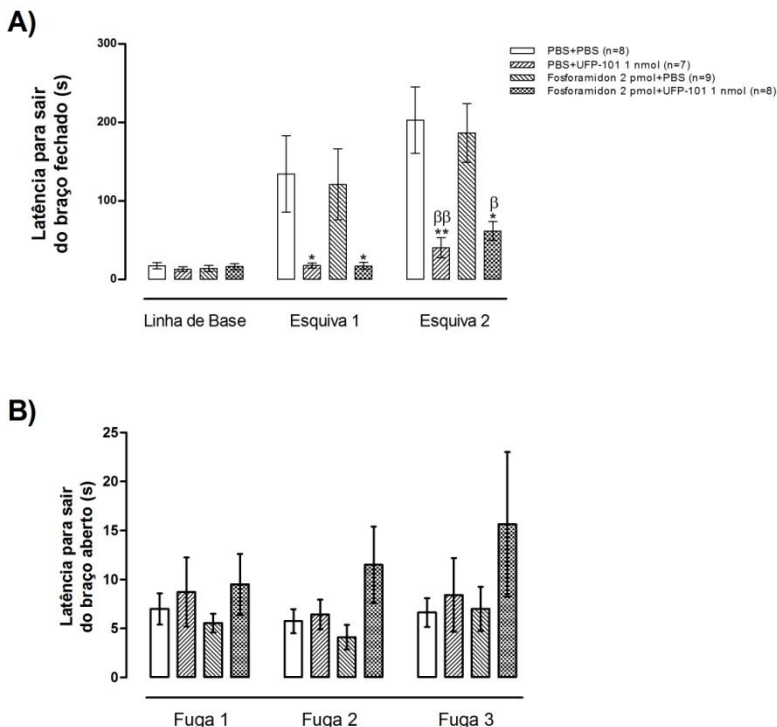


Figura 23 – Influência do pré-tratamento com fosforamidon (2 pmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. O fosforamidon foi administrado no ventrículo lateral 25 min antes da administração de UFP-101. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o último tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. PBS+PBS e ^β $P < 0,05$, ^{ββ} $P < 0,01$ vs. Fosforamidon 2 pmol+PBS na mesma Esquiva (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 7 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (nmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS+PBS	8	49,50 \pm 8,93	11,50 \pm 1,60
PBS+UFP-101 (1)	7	67,71 \pm 12,74	13,28 \pm 1,52
Fosforamidon (0,002)+PBS	9	61,00 \pm 12,09	11,78 \pm 2,55
Fosforamidon (0,002)+UFP-101 (1)	8	89,13 \pm 9,40	14,88 \pm 2,51

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes.

4.6. Influência do pré-tratamento com fosforamidon e bestatina no ventrículo lateral no efeito da administração de UFP-101 no mesmo sítio em ratos Wistar avaliados no LTE

A influência do pré-tratamento com fosforamidon 2 pmol e bestatina 2 nmol no efeito da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral sobre a latência para sair do braço fechado do LTE pode ser observado na Figura 24A. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,28) = 7,82$; $P < 0,01$], do fator repetição [$F(2,56) = 20,02$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,56) = 5,10$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que os tratamentos com PBS+PBS+UFP-101 e fosforamidon+bestatina+PBS reduziram significativamente a latência para sair do braço fechado durante a Esquiva 1 quando comparada ao grupo fosforamidon+bestatina+UFP-101 e na Esquiva 2 em relação aos grupos PBS+PBS+PBS e fosforamidon+bestatina+UFP-101.

Na latência para sair do braço aberto do LTE (Figura 24B), a ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,28) = 1,42$; NS], do fator repetição [$F(2,56) = 1,84$; NS], e da interação entre os fatores [$F(6,56) = 0,52$; NS].

No teste do CA (Tabela 8), a ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo dos tratamentos no número de cruzamentos [$F(3,28) = 0,88$; NS] e comportamentos de levantar [$F(3,28) = 0,75$; NS].

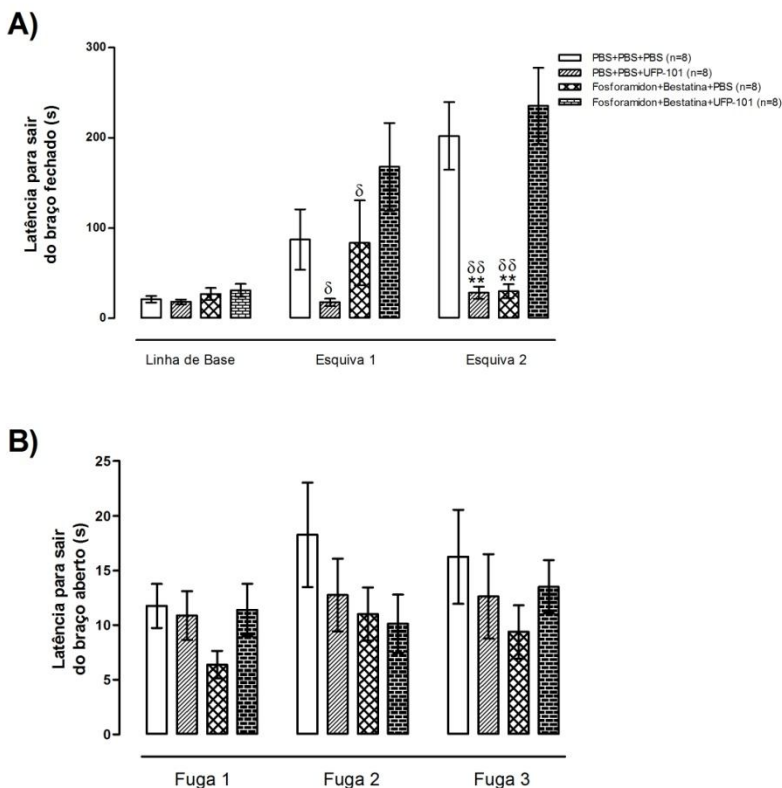


Figura 24 – Influência do pré-tratamento com fosforamidon (2 pmol) e bestatina (2 nmol) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. O fosforamidon e a bestatina foram administrados no ventrículo lateral 25 e 5 min, respectivamente, antes da administração de UFP-101. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquinas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o último tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. ** $P < 0,01$ vs. PBS+PBS+PBS e δ $P < 0,05$, $\delta\delta$ $P < 0,01$ vs. fosforamidon+bestatina+UFP-101 na mesma Esquina (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 8 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS+PBS+PBS	8	63,50 \pm 11,32	10,13 \pm 1,55
PBS+PBS+UFP-101	8	90,50 \pm 14,34	12,38 \pm 3,36
Fosforamidon+Bestatina+PBS	8	85,50 \pm 16,37	13,00 \pm 2,87
Fosforamidon+Bestatina+UFP-101	8	69,75 \pm 11,72	15,50 \pm 2,00

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. Fosforamidon 2 pmol, bestatina 2 nmol e UFP-101 1 nmol. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes.

4.7. Influência do pré-tratamento com PCPA no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral em ratos Wistar avaliados no LTE

Na Figura 25A, pode ser observado a influência do pré-tratamento com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg, I.P., 4 dias) no efeito da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral sobre a latência para sair do braço fechado do LTE. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator repetição [$F(2,72) = 30,94$; $P < 0,01$], porém não revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,36) = 1,65$; NS] e da interação entre os fatores [$F(6,72) = 0,99$; NS].

Na latência para sair do braço aberto do LTE (Figura 25B), a ANOVA para medidas repetidas mostrou um efeito significativo do fator repetição [$F(2,72) = 53,84$; $P < 0,01$]. Entretanto, a mesma análise não revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,36) = 1,71$; NS] e da interação entre os fatores [$F(6,72) = 0,62$; NS].

No teste do CA (Tabela 9), a ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo do tratamento no número de cruzamentos [$F(3,36) = 4,63$; $P < 0,01$] e comportamentos de levantar [$F(3,36) = 4,60$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan revelou que nos animais tratados com veículo+fluoxetina 20 mg/Kg o número de cruzamentos e comportamentos de levantar foram menores em relação aos demais tratamentos, à exceção dos animais tratados com PCPA+salina no número de cruzamentos.

A curva dose resposta dos animais tratados com fluoxetina (10, 15 e 20 mg/Kg) nos testes do LTE e CA, da qual foi escolhida a dose para esses experimentos, pode ser vista no Apêndice I.

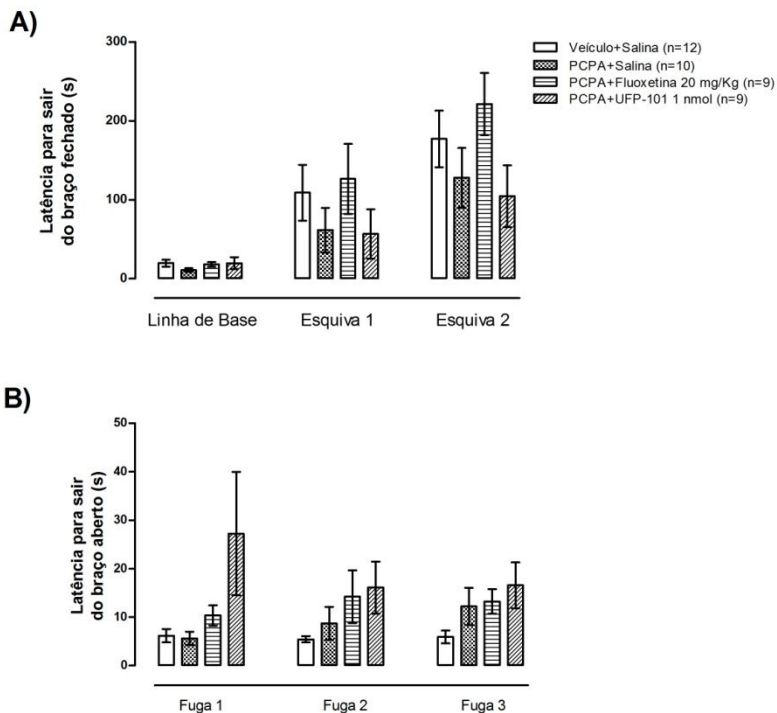


Figura 25 – Influência do pré-tratamento com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg, I.P., 4 dias) no efeito da administração no ventrículo lateral de UFP-101 (1 nmol) nas latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 30 min após o tratamento com salina ou fluoxetina e 5 min após o tratamento com UFP-101. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. ANOVA de medidas repetidas não revelou diferenças significativas.

Tabela 9 – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
Veículo+Salina	12	73,50 \pm 5,69	14,75 \pm 1,58
PCPA+Salina	10	51,30 \pm 5,09	11,10 \pm 1,00 ^{εε}
PCPA+Fluoxetina 20 mg/Kg	9	32,89 \pm 7,90 ^{**}	5,44 \pm 2,01 ^{**}
PCPA+UFP-101 1 nmol	9	57,67 \pm 12,61 ^ε	12,44 \pm 2,63 ^{εε}

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. PCPA (4-cloro-DL-fenilalanina; 100 mg/Kg, I.P., 4 dias). N = número de animais. ^{**} $P < 0,01$ vs. veículo+salina. ^ε $P < 0,05$, ^{εε} $P < 0,01$ vs. PCPA+fluoxetina 20 mg/Kg. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

4.8. Efeito da administração de UFP-101 no NDR de ratos Wistar submetidos ao LTE

Como pode ser observado na Figura 26A, a administração de UFP-101 no NDR reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado do LTE. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 4,11$; $P < 0,05$], do fator repetição [$F(2,58) = 26,16$; $P < 0,01$], e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 2,78$; $P < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com UFP-101, nas doses de 1, 3 e 10 pmol, reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado durante a Esquiva 2 em relação ao tratamento com PBS.

Na Figura 26B, a ANOVA para medidas repetidas não revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(3,29) = 1,41$; NS], do fator repetição [$F(2,58) = 0,07$; NS] e da interação entre os fatores [$F(6,58) = 1,50$; NS] na latência para sair do braço aberto do LTE.

Em relação ao teste do CA (Tabela 10), a ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo do tratamento no número de cruzamentos [$F(3,29) = 1,81$; NS] e comportamentos de levantar [$F(3,29) = 0,52$; NS].

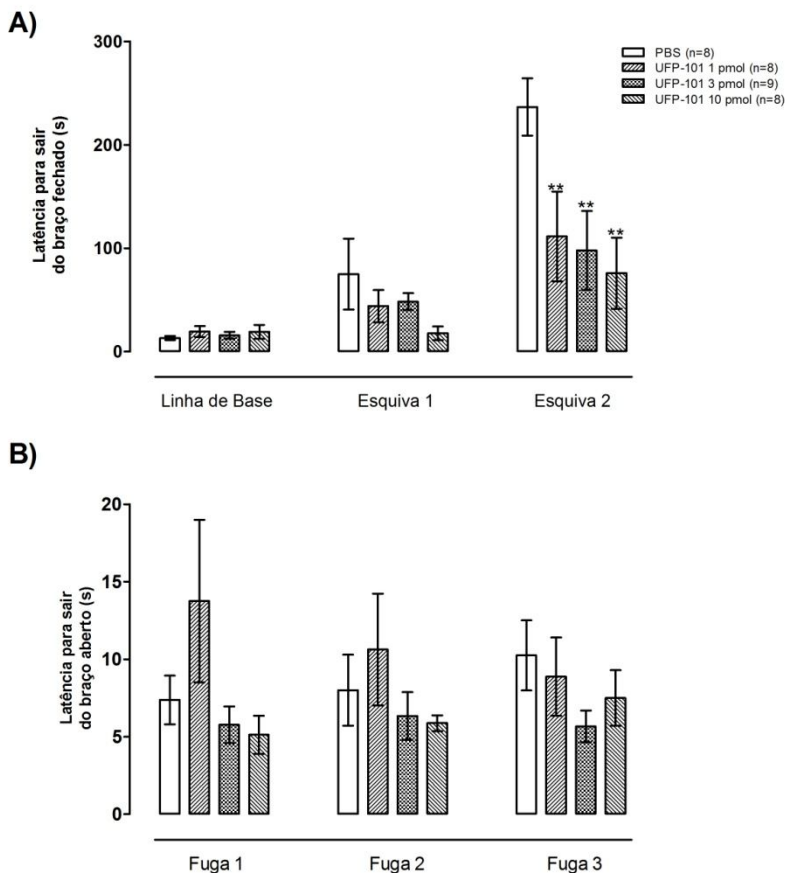


Figura 26 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 pmol) no núcleo dorsal da rafe sobre as latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. Dados representados como média \pm E.P.M.. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1-2) e de um dos braços abertos (Fugas 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas sequencialmente em intervalos de 30 s, começando 5 min após o tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. ** $P < 0,01$ vs. PBS na mesma Esquiva (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 10 – Efeito da administração de UFP-101 (1, 3 ou 10 pmol) no núcleo dorsal da rafe sobre o número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Drogas (pmol)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
PBS	8	62,75 \pm 5,56	8,50 \pm 1,18
UFP-101 (1)	8	52,75 \pm 7,63	11,00 \pm 2,33
UFP-101 (3)	9	75,00 \pm 10,52	10,67 \pm 1,10
UFP-101 (10)	8	80,25 \pm 11,14	10,75 \pm 1,55

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas.

4.9. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley submetidos ao TEE e ao CA

Na Figura 27, pode ser observado o efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas no TEE. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento [$F(4,35) = 10,64$; $P < 0,01$] no número de esferas escondidas. A análise *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com UFP-101, nas doses de 0,3, 1 e 3 nmol, reduziu o número de esferas escondidas em relação ao tratamento com PBS.

No teste do CA (Tabela 11), a ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo do tratamento na distância total percorrida [$F(4,33) = 31,01$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com UFP-101, nas doses de 1 e 3 nmol, reduziu a distância total percorrida quando comparada ao tratamento com PBS.

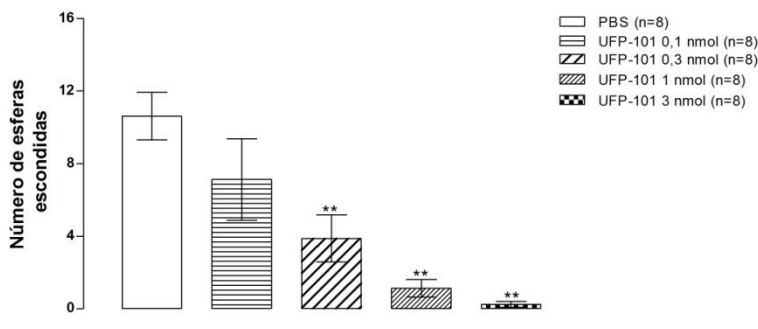


Figura 27 – Efeito da administração de UFP-101 (0,1, 0,3, 1 ou 3 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas. Dados representados como média ± E.P.M.. 5 min após o tratamento os animais foram avaliados durante 30 min no teste de esconder esferas. ** $P < 0,01$ vs. PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 11 – Efeito da administração de UFP-101 (0,1, 0,3, 1 ou 3 nmol) no ventrículo lateral sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. Os valores representam a porcentagem da distância total percorrida em relação ao grupo controle (adotado como sendo 100%).

Drogas (nmol)	N	Distância Total Percorrida (%)
PBS	8	100
UFP-101 (0,1)	7	93,42
UFP-101 (0,3)	8	89,80
UFP-101 (1)	8	59,05**
UFP-101 (3)	7	17,95**

5 min após o tratamento os animais foram avaliados durante 30 min no teste do campo aberto. N = número de animais. ** $P < 0,01$ vs. PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

4.10. Efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC de ratos Sprague-Dawley

Os resultados demonstraram que a taxa de disparo dos neurônios do LC foi inibida após a administração de UFP-101 0,3 nmol (N=5) e 1 nmol (N=3). Nenhuma alteração significativa foi encontrada na pressão arterial.

As figuras 28 e 29 apresentam exemplos representativos da pressão arterial (A) e da taxa de disparo dos neurônios do LC (B) antes e após a administração de UFP-101 no ventrículo lateral.

Os resultados da padronização do teste de registro da atividade elétrica dos neurônios do LC, após a administração endovenosa de clonidina e morfina, podem ser observados no Apêndice II e III.

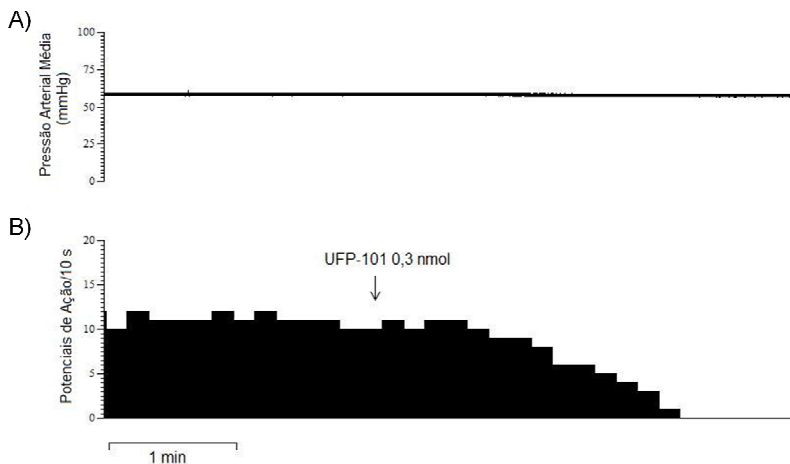


Figura 28 – Efeito da administração de UFP-101 0,3 nmol no ventrículo lateral sobre a pressão arterial média (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) *in vivo*.

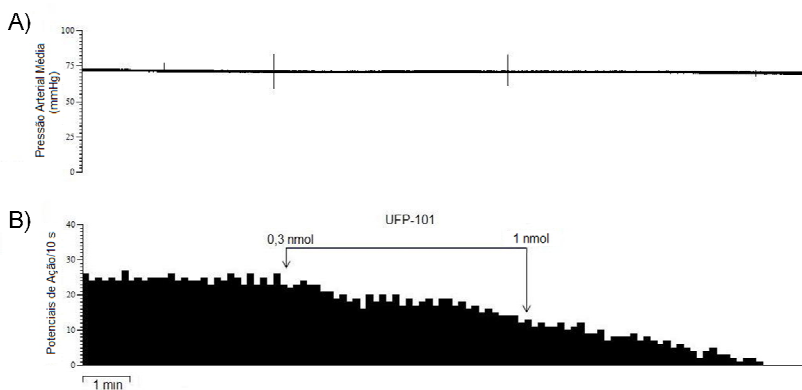


Figura 29 – Efeito da administração de UFP-101 0,3 e 1 nmol no ventrículo lateral sobre a pressão arterial média (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) *in vivo*.

4.11. Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley no TEE e no CA

Na Figura 30 pode ser observada a influência do pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg, I.P.) no efeito da administração de UFP-101 (1 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento no número de esferas escondidas [$F(3,28) = 7,42$; $P < 0,01$]. A análise *post-hoc* de Duncan revelou que os tratamentos com salina+UFP-101 0,3 nmol e naloxona 1 mg/Kg+ UFP-101 0,3 nmol reduziram o número de esferas escondidas quando comparados aos tratamentos com salina+PBS e naloxona 1 mg/Kg+PBS.

Em relação à distância total percorrida (Tabela 12), a ANOVA de uma via não revelou nenhuma diferença significativa do tratamento [$F(3,27) = 0,48$; NS].

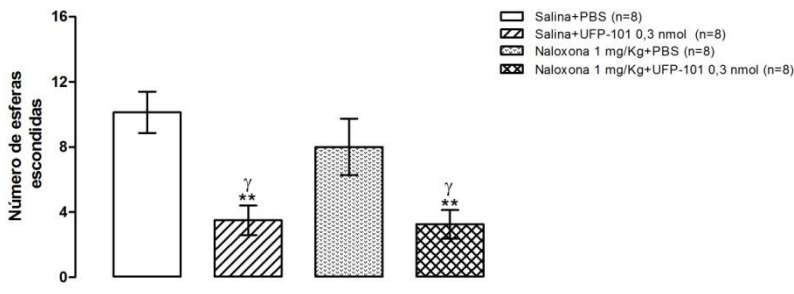


Figura 30 – Influência do pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg, I.P.) no efeito da administração de UFP-101 (0,3 nmol) no ventrículo lateral sobre o número de esferas escondidas. Dados representados como média \pm E.P.M.. Naloxona e UFP-101 foram administrados 30 e 5 min, respectivamente, antes dos animais serem submetidos ao teste de esconder esferas. ** $P < 0,01$ vs. salina+PBS, γ $P < 0,05$ vs. naloxona 1 mg/Kg+PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

Tabela 12 – Distância total percorrida no teste do campo aberto. Os valores representam a porcentagem da distância total percorrida em relação ao grupo controle (adotado como sendo 100%).

Drogas	N	Distância Total Percorrida (%)
Salina+PBS	8	100
Salina+UFP-101 0,3 nmol	8	94,87
Naloxona 1 mg/Kg+PBS	8	97,41
Naloxona 1 mg/Kg+UFP-101 0,3 nmol	7	97,17

Naloxona e UFP-101 foram administrados 30 e 5 min, respectivamente, antes dos animais serem submetidos ao teste do campo aberto. N = número de animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas.

4.12. Influência do pré-tratamento com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley sobre a atividade elétrica dos neurônios do LC

Os resultados demonstraram que o pré-tratamento endovenoso com naloxona (1 mg/Kg) não alterou *per se* a taxa de disparo dos neurônios do LC e a pressão arterial. Entretanto, a naloxona preveniu a redução na taxa de disparo dos neurônios do LC promovida pela administração de UFP-101 (0,3 e 1 nmol) no ventrículo lateral. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na pressão arterial.

Na Figura 31, está um exemplo representativo da influência do pré-tratamento endovenoso com naloxona no efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a pressão arterial e a atividade elétrica dos neurônios do LC.

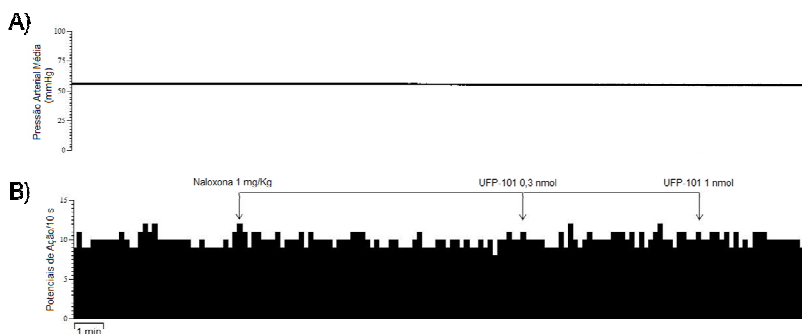


Figura 31 – Influência do pré-tratamento endovenoso com naloxona (1 mg/Kg) no efeito da administração de UFP-101 (0,3 e 1 nmol) no ventrículo lateral sobre a pressão arterial média (A) e a taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) *in vivo*.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se pouco sobre o efeito da administração central do antagonista peptídico competitivo NOP UFP-101 (Calo et al., 2002), nos comportamentos relacionados com a ansiedade. Neste estudo, nosso primeiro objetivo foi avaliar o efeito da administração central de UFP-101 no comportamento de ratos Wistar submetidos ao LTE. Os resultados mostraram, pela primeira vez, que a administração central de UFP-101 apresenta um efeito do tipo ansiolítico, pois o UFP-101, nas doses de 1 e 3 nmol, reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado do LTE. Este efeito parece específico, pois nenhuma dose de UFP-101 foi capaz de alterar significativamente a latência para sair do braço aberto do LTE, bem como a atividade locomotora avaliada no teste do CA.

Entretanto, as evidências envolvendo o sistema N/OFQ-receptor NOP nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade são contraditórias. A tabela II, Apêndice IV, traz um resumo de alguns dos efeitos encontrados, levando em consideração o local de injeção e a espécie animal, após a administração de N/OFQ e UFP-101 em diferentes testes de ansiedade em roedores. Vários grupos de pesquisa demonstraram, usando diferentes testes comportamentais, que a administração de N/OFQ no ventrículo lateral promove um efeito do tipo ansiolítico (Jenck et al., 1997; Gavioli et al., 2002; Kamei et al., 2004). Efeito similar também foi observado com a administração intraperitoneal de Ro64-6198, agonista não peptídico do receptor NOP, em três espécies distintas de roedores: ratos, camundongos e cobaias (Jenck et al., 2000; Varty et al., 2005). Além disso, camundongos *knockout* para a preproN/OFQ (Köster et al., 1999) e ratos NOP^{-/-} (Rizzi et al., 2011) apresentaram maior incidência de comportamentos relacionados com a ansiedade em testes neofóbicos, como o LCE.

Por outro lado, Fernandez e colaboradores (2004), utilizando testes de ansiedade e doses de N/OFQ similares a de estudos prévios que haviam observado um efeito do tipo ansiolítico, demonstraram que a administração de N/OFQ no ventrículo lateral promove um efeito do tipo ansiogênico. Relataram ainda, que a administração central de UFP-101 bloqueia o aumento induzido pela N/OFQ na concentração plasmática de corticosterona, sem modificá-la *per se* (Leggett et al., 2006). Green e colaboradores (2007) também demonstraram um efeito do tipo ansiogênico após a administração de N/OFQ no ventrículo lateral (0,01, 0,1 e 1 nmol), na amígdala (0,1 e 1 nmol) ou no núcleo do leito da estria terminal (1 nmol) de ratos avaliados no CA. Além disso, camundongos NOP^{-/-} apresentam redução nos comportamentos

relacionados com ansiedade nos testes do LTE e do comportamento alimentar suprimido pela novidade em relação a camundongos NOP^{+/+} (Gavioli et al., 2007).

A N/OFQ, via receptor NOP, parece exercer um controle inibitório tônico sobre a liberação basal de noradrenalina no núcleo basolateral da amígdala, pois a administração intraperitoneal de J-113397, antagonista competitivo não-peptídico do receptor NOP, promove um aumento significativo (~200%) na liberação de noradrenalina no núcleo basolateral da amígdala (Kawahara et al., 2004). A amígdala é uma importante estrutura no processamento de estímulos aversivos, na integração de respostas ao estresse e na consolidação da memória (LeDoux, 2000). Assim, e de acordo com os dados da literatura vistos anteriormente, não é surpreendente que o UFP-101 apresente um efeito do tipo ansiolítico. Entretanto, nesse momento as razões para esse efeito são desconhecidas.

Uma das possíveis razões poderia ser o próprio teste de ansiedade utilizado para avaliar o efeito dos ligantes do receptor NOP, pois camundongos NOP^{-/-} apresentaram um fenótipo do tipo ansiogênico quando submetidos ao LCE e do tipo ansiolítico no LTE (Gavioli et al., 2007). Resultados antagônicos foram também encontrados com a administração, na mesma faixa de doses, de N/OFQ em ratos avaliados no LCE – efeitos do tipo ansiolítico (Jenck et al., 1997) e ansiogênico (Fernandez et al., 2004), e nenhuma explicação plausível foi encontrada. Assim, parece que o sistema N/OFQ-receptor NOP está implicado no controle dos estados de ansiedade, mas o efeito específico pode depender de características ainda não identificadas dos testes de ansiedade.

Outra possível razão, para o efeito encontrado no LTE após a administração de UFP-101 no ventrículo lateral, poderia ser a faixa de doses utilizada. Vitale e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de UFP-101 no ventrículo lateral na dose de 10 nmol (a única testada) não promoveu qualquer mudança significativa nos parâmetros comportamentais avaliados no LCE e no esconder defensivo condicionado (do inglês, *conditioned defensive burying tests*). Dessa forma, nossos resultados no LTE demonstraram que as doses de 1 e 3 nmol de UFP-101 podem ser as mais adequadas para detectar os efeitos do tipo ansiolítico da administração de UFP-101 no ventrículo lateral. Estudos futuros com outros testes de ansiedade, utilizando a mesma faixa de doses e via de administração empregadas neste estudo, são necessários para confirmar o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101, aqui observado. Ainda mais que, Goeldner e colaboradores (2010)

demonstraram que a infusão bilateral no hipocampo dorsal de UFP-101 1 e 3 nmol, a mesma faixa de doses utilizada por nós, não alterou as medidas de ansiedade no teste da caixa-claro escuro, apesar de produzir um efeito do tipo antidepressivo em camundongos submetidos ao teste da natação forçada. A este respeito, parece existir uma dissociação no envolvimento do sistema N/OFQ-receptor NOP hipocampal nos comportamentos relacionados com ansiedade e depressão, além das diferenciações entre as linhagens de animais utilizadas nos diferentes testes (ratos *vs.* camundongos).

Ainda em relação às doses de UFP-101 que apresentaram efeito no LTE, chama a atenção o fato de a curva dose-resposta ser ao contrário, isto é, o efeito do tipo ansiolítico no LTE foi encontrado somente com doses menores de UFP-101 (1 e 3 nmol), enquanto a dose maior (10 nmol) não apresentou efeito algum. Quando se avalia as curvas dose-resposta promovidas pelos neuropeptídeos é comum encontrá-las em forma de U ou em forma de sino (U invertido). Por exemplo, a administração do fragmento C-terminal da substância P [SP(7-11)] nas doses de 25, 50 e 100 ng na SCPD de ratos Wistar aumentou o número de cruzamentos, de comportamentos de levantar e de auto-limpeza no teste do CA, enquanto nas doses de 10 e 200 ng esses parâmetros comportamentais não foram alterados, mostrando uma curva em forma de U invertido (Araujo et al., 1998). Assim, nossos resultados podem representar somente uma parte da curva-dose resposta da administração central de UFP-101 no LTE, como a fase ascendente da curva dose-resposta em forma de U. A investigação de doses menores de UFP-101, como 0,3 e 0,1 nmol, ajudaria a completar esse estudo dose-resposta no LTE.

A possibilidade do efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE ser proveniente de um aumento na atividade locomotora pode ser descartada, pois no teste do CA o número de cruzamentos, assim como o de comportamentos de levantar, não foi alterado pelo UFP-101. Nossos resultados no CA corroboram os da literatura, que haviam demonstrado que o bloqueio farmacológico ou a deleção gênica do receptor NOP não afeta a locomoção espontânea de roedores (Calo' et al., 2002 e 2005; Gavioli et al., 2003 e 2007; Nischi et al., 1997).

Vários estudos têm demonstrado a importância do sistema N/OFQ-receptor NOP na cognição. Níveis elevados na expressão do RNAm da preproN/OFQ, do peptídeo N/OFQ e do receptor NOP são encontrados em regiões cerebrais envolvidas com os processos de aprendizagem e memória, *e.g.*, hipocampo, amígdala e córtex cerebral (Mollereau e Mouldedous, 2000; Neal et al., 1999). Goeldner e

colaboradores (2008) demonstraram que as administrações de N/OFQ no ventrículo lateral (1 nmol) ou no hipocampo dorsal (3 nmol) e de Ro64-6198 (1 mg/Kg, I.P.), um agonista não-peptídico e seletivo do receptor NOP, promoveram um déficit na memória de longa duração em camundongos submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos. Em contraste, o Ro64-6198 não afetou a memória de curta duração (medida 3 h após o treino) e nem a evocação (quando injetado imediatamente antes do teste). Já o pré-tratamento intra-hipocampal com UFP-101 5 nmol não apresentou efeito *per se*, mas bloqueou o prejuízo promovido pelo Ro64-6198 nesta tarefa.

Outros estudos também demonstraram os déficits de memória promovidos pela ativação do receptor NOP com N/OFQ e Ro64-6198, usando diferentes tarefas cognitivas, como o labirinto aquático de Morris e a caixa de esQUIVA passiva (Fornari et al., 2008; Redrobe et al., 2000; Sandin et al., 1997), enquanto a deleção gênica do receptor NOP ou da preproN/OFQ levam a efeitos opostos (Manabe et al., 1998; Higgins et al., 2002). Por outro lado, a administração no ventrículo lateral de N/OFQ em baixas doses (fmol) atenua os prejuízos na memória induzidos pela escopolamina ou mecamilamina em roedores (Hiramatsu e Inoue, 2000; Hiramatsu et al., 2008).

Nesse contexto, o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 nas doses de 1 e 3 nmol no LTE não parece ser secundário às alterações cognitivas, como um prejuízo na aprendizagem da tarefa de esQUIVA inibitória, pois a administração intra-hipocampal de UFP-101 5 nmol não alterou *per se* os processos de aprendizagem e memória em camundongos submetidos a tarefa de reconhecimento de objetos (Goeldner et al., 2008), enquanto camundongos NOP^{-/-} apresentaram um melhor desempenho nos testes do labirinto aquático de Morris e da caixa de esQUIVA passiva, quando comparados com os NOP^{+/+} (Manabe et al., 1998).

Em relação à latência para sair do braço aberto do LTE, Gavioli e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos NOP^{-/-} apresentam um fenótipo do tipo panicolítico no LTE, quando comparados a camundongos NOP^{+/+}. Entretanto, nossos resultados demonstraram que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 não prejudicou a latência para sair do braço aberto do LTE. Um motivo para essa falta de efeito pode ser a duração do tratamento com UFP-101, pois fármacos com propriedades anti-pânico na clínica, como a fluoxetina, um ISRS, somente apresentaram efeitos do tipo panicolítico no LTE após tratamento crônico (Poltronieri et al., 2003).

Na sequência, resolvemos investigar se o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE ocorria via receptores NOP (Experimento 3). Para isso, pré-tratamos os animais com uma dose inefetiva de N/OFQ (0,3 nmol; escolhida no Experimento 2) no LTE, da mesma forma que Gavioli e colaboradores (2004) preveniram o efeito do tipo antidepressivo do UFP-101 no teste de suspensão pela cauda com N/OFQ. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com N/OFQ 0,3 nmol preveniu o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 1 nmol no LTE, sugerindo que esse efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 ocorre via receptores NOP.

Os resultados encontrados com a administração no ventrículo lateral de baixas doses de N/OFQ (0,01, 0,03 e 0,1 nmol) no LTE foram similares aos do UFP-101, ou seja, apresentaram um efeito do tipo ansiolítico, enquanto a administração de N/OFQ 1 nmol apresentou um efeito do tipo ansiogênico. Os resultados da administração central de N/OFQ 1 nmol no LTE e no CA não foram apresentados, pois optamos por não medir as latências de Esquiva 1 e 2 no LTE, uma vez que os animais permaneceram 300 s na Linha de Base e a análise estatística desses dados pelos testes estatísticos adotados neste estudo não seria possível. Uma alternativa seria a realização das medidas de Esquiva 1 e 2 no LTE, mesmo os animais permanecendo 300 s na Linha de Base.

Como comentado anteriormente, os resultados da literatura obtidos com a administração no ventrículo lateral de N/OFQ são contraditórios. Desta forma, nossos resultados corroboram ou contradizem os dados da literatura dependendo da referência utilizada. Aqueles questionamentos levantados quanto aos efeitos do UFP-101 no LTE serem provenientes de uma alteração na atividade locomotora e nos processos de aprendizagem e memória devem ser aplicados também aos resultados da N/OFQ.

Em relação à atividade locomotora, estudos prévios demonstraram que a administração de altas doses de N/OFQ (1 – 10 nmol) no ventrículo lateral inibe a atividade locomotora (Reinscheid et al., 1995; Devine et al., 1996; Rizzi et al., 2001), enquanto a administração de baixas doses (0,005 – 0,05 nmol) aumenta esta medida comportamental (Florin et al., 1996). Para Rizzi e colaboradores (2001) a administração de baixas doses de N/OFQ (0,001 – 0,01 nmol) não altera significativamente a atividade locomotora. Como visto anteriormente, o bloqueio farmacológico ou a deleção gênica do receptor NOP não afeta a locomoção espontânea de roedores (Calo' et al., 2005; Gavioli et al., 2003 e 2007; Nischi et al., 1997), mas aumenta a atividade motora induzida pelo exercício (Marti et al., 2004b). Desta

forma, o efeito do tipo ansiogênico de 1 nmol de N/OFQ no LTE poderia ser atribuído a um prejuízo na atividade locomotora, mas nenhuma diferença significativa foi observada no teste do CA para os animais tratados com N/OFQ 1 nmol, em relação ao grupo controle [(Número de cruzamentos: PBS = $53,00 \pm 7,12$; N/OFQ 1 nmol = $47,75 \pm 7,85$), (Número de comportamentos de levantar: PBS = $11,54 \pm 1,56$; N/OFQ 1 nmol = $12,88 \pm 2,09$)].

Uma alternativa seria a avaliação da atividade locomotora no próprio LTE, conforme descrito por Pinheiro e colaboradores (2007) que propuseram que quando as latências para sair do braço fechado e aberto do LTE variam em direções opostas não há influência motora do tratamento na resposta encontrada. Por outro lado, quando as latências são igualmente aumentadas ou diminuídas pode haver prejuízo ou melhora, respectivamente, na locomoção. Entretanto, nossos resultados das latências para sair do braço fechado e aberto do LTE dos animais tratados com 1 nmol de N/OFQ não obedecem nenhum dos requisitos anteriores, pois todos os animais permaneceram 300 s na Linha de Base (as latências de Esquiva 1 e 2 não foram tomadas) e as medidas das latências para sair do braço aberto do LTE não aumentaram ou diminuíram (Fuga 1 = $11,14 \pm 2,19$; Fuga 2 = $14,42 \pm 7,66$; Fuga 3 = $8,57 \pm 3,45$), impossibilitando esta avaliação.

Usando testes distintos, dois resultados experimentais demonstraram que o sistema N/OFQ-receptor NOP não exerce um papel importante na modulação de comportamentos relacionados ao pânico. Em um deles, realizado na bateria de teste de defesa do camundongo, a administração de N/OFQ no ventrículo lateral não alterou a resposta de fuga e a distância de esquiva gerada pela exposição ao predador, um rato, que são especialmente diminuídas por fármacos panicolíticos (Griebel et al., 1999). Em outro, realizado no modelo de fuga induzida pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), a administração intraperitoneal de Ro64-6198 não atenuou a aversão promovida pela estimulação elétrica dessa estrutura (Jenck et al., 2000).

Em contrapartida, Uchiyama e colaboradores (2008) demonstraram que a administração na amígdala central de N/OFQ 32 pmol não alterou a latência de esquiva inibitória, mas prejudicou a latência de fuga no LTE, indicando um efeito do tipo panicolítico. Entretanto, devemos ter cuidado ao comparar nossos resultados com os de Uchiyama e colaboradores (2008), porque, apesar da diferença entre os sítios de administração e as consequências que isso possa acarretar, alguns dos procedimentos experimentais empregados por Uchiyama e

colaboradores são bem diferentes dos adotados por nós e da maioria dos pesquisadores que utilizam atualmente o LTE como teste de ansiedade, pois os animais não foram pré-expostos a um dos braços abertos no dia anterior ao teste, e as medidas das latências de esquivas inibitória e de fuga não foram tomadas nos mesmos animais, o que, na prática, inviabiliza comparações.

Em resumo, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a administração central de UFP-101, apresenta um efeito do tipo ansiolítico no LTE e que esse efeito ocorre via receptor NOP, pois a N/OFQ, o agonista endógeno desse receptor, preveniu o efeito do UFP-101 neste paradigma experimental. Inevitavelmente, após analisar os resultados da administração central de N/OFQ e de UFP-101 no LTE, surge uma pergunta: como a ativação e o bloqueio dos receptores NOP produz o mesmo efeito ansiolítico no LTE? Uma das respostas pode estar relacionada à degradação enzimática do UFP-101, com formação de metabólitos ativos.

A este respeito, após liberação, os neuropeptídeos podem ser inativados por peptidases e/ou pela internalização do complexo ligante-receptor, mecanismo importante também para a regulação do receptor e para a sinalização trans-membrana (McConalogue e Bunnett, 1998; García-López et al., 2002). As peptidases, também chamadas de enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases, são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas e podem ser divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases catalisam a hidrólise das ligações próximas às extremidades amino(N)-terminal e carboxi(C)-terminal da cadeia polipeptídica, como as aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidil aminopeptidase. Já as endopeptidases catalisam a hidrólise das ligações internas da cadeia polipeptídica, tais como as serina (treonina) endopeptidases, cisteína endopeptidases e metaloendopeptidases (García-López et al., 2002).

Além de formar metabólitos inativos, a ação das peptidases pode resultar na formação de fragmentos que mantêm a atividade farmacológica do peptídeo natural. Por exemplo, dois dos principais metabólitos encontrados no hipocampo dorsal de ratos após a administração bilateral nessa região de N/OFQ 10 nmol foram identificados como N/OFQ(1-13) e a N/OFQ(14-17) (Sandin et al., 1999). Recentemente, Miwa e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de N/OFQ ou do fragmento N/OFQ(14-17), mas não o fragmento N/OFQ(1-13), em doses muito baixas (fmol), no hipocampo de camundongos, atenuaram o prejuízo na memória induzido por U0126, um inibidor de proteína quinase ativada por mitógeno (MEK).

Em outras situações, a ação das peptidases pode resultar na formação de fragmentos com atividade farmacológica distinta do peptídeo natural. Por exemplo, a administração na SCPD do fragmento N-terminal da substância P [SP(1-7)] apresentou um efeito do tipo ansiolítico em ratos submetidos ao LCE, enquanto as administrações da substância P e do fragmento C-terminal [SP(6-11)] promoveram um efeito do tipo ansiogênico (De Araujo et al., 2001). Alguns estudos têm sugerido que os efeitos da administração central de substância P podem ser devidos à sua quebra enzimática, que produz fragmentos N- e C-terminal ativos (Hall et al., 1989; Igwe et al., 1990).

Dessa forma, podemos imaginar que, após a administração no ventrículo lateral, um fragmento proveniente da degradação enzimática do UFP-101 possa ser responsável pelo perfil farmacológico semelhante ao da N/OFQ, ou seja, pelo efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE. Para testar essa hipótese, avaliamos os efeitos comportamentais da administração no ventrículo lateral de UFP-101 no LTE em animais pré-tratados com inibidores de peptidases (bestatina no Experimento 4; fosforamidon no Experimento 5; e fosforamidon+bestatina no Experimento 6).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com bestatina 2 nmol, um potente inibidor competitivo da enzima aminopeptidase N (Wang et al., 2010), preveniu o efeito do tipo ansiolítico promovido pela administração central de UFP-101 1 nmol no LTE. O pré-tratamento com fosforamidon 2 pmol, um inibidor competitivo natural da enzima endopeptidase 24.11 (Roques et al., 1993), por outro lado não foi capaz de prevenir o efeito do UFP-101 1 nmol no LTE. A bestatina e o fosforamidon não alteraram *per se* nenhum dos parâmetros avaliados no LTE e no CA, mas o pré-tratamento com a associação fosforamidon 2 pmol+bestatina 2 nmol apresentou um efeito do tipo ansiolítico no LTE, pois reduziu significativamente a latência para sair do braço fechado do LTE. Este efeito parece específico, pois essa associação não foi capaz de alterar significativamente a latência para sair do braço aberto do LTE, bem como a atividade locomotora avaliada no teste do CA.

O UFP-101 faz parte de um grupo de agonistas e antagonistas NOP desenvolvidos a partir de estudos de relação estrutura-atividade tendo como base a N/OFQ, como pode ser observado na Figura 32 (Mustazza e Bastanzio, 2010). Para sintetizar o UFP-101, Calo' e colaboradores (2002) combinaram algumas modificações químicas, realizadas anteriormente na sequência de aminoácidos da N/OFQ, em uma única molécula. Uma delas foi substituir o primeiro aminoácido,

fenilalanina (Phe, do inglês *phenylalanine*), por Nphe, onde um átomo de carbono da cadeia lateral da Phe foi substituído por um átomo de nitrogênio. Essa simples modificação foi suficiente para transformar o agonista NOP N/OFQ(1-13)-NH₂ (Guerrini et al., 1997) em um antagonista [Nphe¹]N/OFQ(1-13)-NH₂, com atividade confirmada em diferentes ensaios *in vivo* e *in vitro* (Calo' et al., 2000b). Outras modificações foram as substituições dos aminoácidos leucina (Leu, na posição 14) por arginina (Arg) e alanina (Ala, na posição 15) por lisina (Lys), que deram origem a um potente agonista NOP, [Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ (Okada et al., 2000). Por fim, a extremidade C-terminal foi amidada, pois esta modificação química deixou o peptídeo N/OFQ-NH₂ menos susceptível à degradação enzimática, quando comparado à N/OFQ (Calo' et al., 2000a).

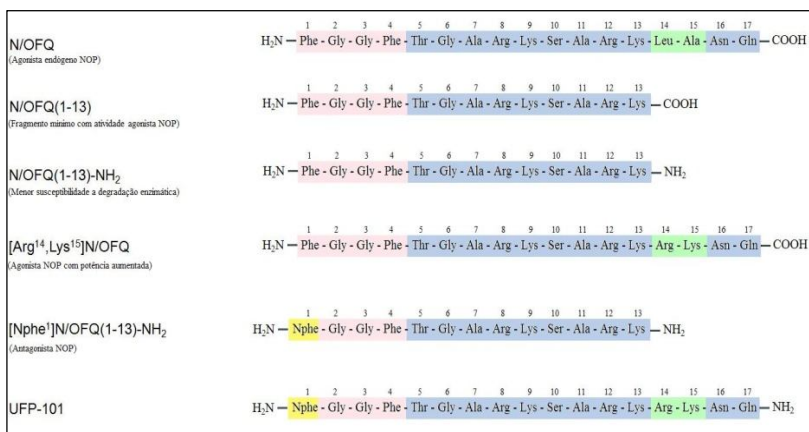


Figura 32 – Modificações na sequência de aminoácidos do peptídeo endógeno N/OFQ que levaram a síntese do UFP-101. Abreviações mais importantes: Phe = fenilalanina; Nphe = fenilalanina com um átomo de carbono da cadeia lateral substituído por um átomo de nitrogênio; Leu = leucina; Ala = alanina; Arg = Arginina; Lys = Lisina. Adaptado de Lambert, 2008.

Até o momento não existem estudos sobre o metabolismo do UFP-101, bem como o resultado da modificação do aminoácido Phe¹ por Nphe¹ na ação da aminopeptidase N, enzima que catalisa a hidrólise do fragmento N-terminal de aminoácidos básicos ou neutros (Ala>Phe>Leu>Gly) dos peptídeos (Luan e Xu, 2007; Wang et al., 2010). Entretanto, pelos nossos resultados, podemos supor que o pré-tratamento com bestatina impediu a hidrólise da ligação Nphe¹-Gly² e, conseqüentemente, a liberação dos fragmentos Nphe¹ (responsável pela propriedade antagonista do UFP-101) e [Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ(2-17)NH₂.

Um fragmento C-terminal, [Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ(2-17)NH₂ ou um metabólito da sua degradação por exopeptidases e/ou endopeptidases, pode ser responsável pelo efeito ansiolítico da administração central do UFP-101 no LTE. É importante ressaltar que em alguns dos ensaios *in vitro* realizados para caracterizar o perfil farmacológico do UFP-101 foram utilizados inibidores de peptidases, como o captopril, a bestatina e o fosforamidon (Calo' et al., 2002). Assim os resultados encontrados podem ser diferentes dos obtidos *in vivo* e/ou *in vitro* sem a administração desses inibidores.

Dois fatos chamaram a atenção quando comparamos nossos resultados do metabolismo do UFP-101 com os da literatura sobre a N/OFQ. Um deles foi o papel das enzimas aminopeptidase N e endopeptidase 24.11 no metabolismo do UFP-101 e da N/OFQ. Diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as enzimas aminopeptidase N e endopeptidase 24.11 estão envolvidas no metabolismo da N/OFQ (Montiel et al., 1997; Noble e Roques, 1997; Sakurada et al., 2002). Sakurada e colaboradores (2002) demonstraram, usando membranas sinápticas da medula espinhal de camundongos incubadas em um meio contendo N/OFQ (na presença ou ausência de inibidores de peptidases), que a degradação da N/OFQ foi inibida em 11% pela bestatina e em 50% pelo fosforamidon. Além disso, a resposta de coçar, morder e lambe as patas traseiras, induzida pela injeção intratecal de baixas doses de N/OFQ (na ordem de fmol), foi potencializada somente pela administração, na mesma via, de fosforamidon. Nossos resultados, por outro lado, mostraram que somente a bestatina preveniu o efeito ansiolítico da administração central de UFP-101 no LTE. Desta forma, o conjunto destes dados parece indicar que, no sistema nervoso central, a enzima aminopeptidase N parece exercer um papel crítico na degradação do UFP-101, enquanto a enzima endopeptidase 24.11 parece exercer um papel crítico no metabolismo da N/OFQ.

Além disso, a relação estabelecida por Calo' e colaboradores (2000a) entre a presença do grupo -NH₂ e a degradação enzimática pode ser questionada, pois quando estes pesquisadores estabeleceram tal relação utilizaram um coquetel de inibidores enzimáticos (amastatina, bestatina, captopril e fosforamidon), assim a amidação do grupo C-terminal pode tornar o peptídeo menos susceptível à degradação por determinada(s) enzima(s). Nesse sentido, nossos resultados parecem indicar que a presença do grupo -NH₂ na porção C-terminal deixa os peptídeos, que têm a sequência de aminoácidos semelhantes à da N/OFQ, menos resistentes ou susceptíveis à degradação pela enzima

endopeptidase 24.11. Talvez por esta razão, o fosforamidon não tenha influenciado o efeito do UFP-101 no LTE, em contraste com a ação da enzima aminopeptidase N, que não tem sua atividade influenciada pelo grupo $-NH_2$.

No entanto, mais estudos sobre o metabolismo do UFP-101 são necessários, como a caracterização *in vivo* e *in vitro* dos metabólitos do UFP-101, inclusive em outros tecidos [no sangue humano a aminopeptidase N demonstrou ser a enzima mais importante na degradação da N/OFQ (Yu et al., 1996)], bem como a caracterização do efeito da administração central de um antagonista NOP não peptídico, *e.g.*, o J-113397, no LTE (a este respeito não há ainda nenhum dado na literatura).

Outro fato interessante foi um fragmento C-terminal do UFP-101 ser o responsável pelo efeito do tipo ansiolítico observado no LTE. Estudos de relação estrutura-atividade da N/OFQ estabeleceram que o fragmento N-terminal é mais crítico para a ligação ao receptor NOP que o fragmento C-terminal, que os aminoácidos Phe¹, Gly², Phe⁴ e Arg⁸ são os mais importantes para a afinidade e atividade no receptor NOP, e que o primeiro aminoácido, Phe¹, é essencial para a seletividade, pois sua substituição por Tyr origina um peptídeo ativo tanto em receptores NOP quanto nos demais receptores opióides (para revisão ver Mustazza e Bastanzio, 2010). Efeitos semelhantes aos da administração no ventrículo lateral de N/OFQ e de UFP-101 foram encontrados em estudos de frequência cardíaca de camundongos (Buermeister e Kapusta, 2007). Vários estudos demonstraram que a administração no ventrículo lateral de N/OFQ promove, de maneira dose dependente, bradicardia, hipotensão e diurese em camundongos (Buermeister e Kapusta, 2007) e em ratos conscientes (Kapusta et al., 1997; Kapusta e Kenigs, 1999) ou anestesiados (Chen et al., 2002). Buermeister e Kapusta (2007) demonstraram que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 promove uma redução na frequência cardíaca, semelhante a N/OFQ, sem alterar a pressão arterial média e o volume urinário. Estes pesquisadores descreveram que esses efeitos do UFP-101 não são abolidos em camundongos NOP^{-/-} (comunicação pessoal). Assim, podemos imaginar que o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE poderia ser decorrente de um fragmento C-terminal que age em outro tipo de receptor, como nos demais receptores opióides.

Como veremos a seguir, a administração endovenosa de naloxona preveniu o efeito da administração de UFP-101 no ventrículo lateral sobre a taxa de disparo dos neurônios do LC. Entretanto, não devemos esquecer que nossos resultados (Experimento 3) demonstraram

que a N/OFQ preveniu o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE, indicando que esse efeito ocorre via receptor NOP. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar a participação do receptor NOP e dos demais receptores opióides nos efeitos comportamentais produzidos pela administração central de UFP-101.

Nossos resultados demonstraram também que a administração no ventrículo lateral de fosforamidon+bestatina apresentou *per se* um efeito do tipo ansiolítico no LTE. O tratamento com UFP-101 bloqueou o efeito do tipo ansiolítico da associação dos inibidores de peptidase, sugerindo uma regulação tônica da N/OFQ endógena na tarefa de esquivar inibitória no LTE. Esses resultados estão de acordo com trabalhos prévios que demonstraram que a N/OFQ atenua a inibição comportamental quando animais são expostos a condições estressantes (Jenck et al., 1997; Gavioli et al., 2002; Kamei et al., 2004; Köster et al., 1999; Rizzi et al., 2011). Além disso, Sakurada e colaboradores (2002) demonstraram que a resposta comportamental induzida pela injeção intratecal de baixas doses de N/OFQ foi potencializada pela administração concomitante de bestatina e fosforamidon, na mesma faixa de doses utilizada por nós.

Uma alternativa à hipótese anterior (do efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE ser proveniente de um fragmento da degradação enzimática) poderia ser a possibilidade do UFP-101 bloquear o efeito do tipo ansiogênico promovido pela atividade tônica do sistema N/OFQ-receptor NOP. Entretanto, os poucos dados encontrados na literatura não corroboram tal possibilidade, mas contribuem para outra hipótese para o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101. Em um desses estudos, Kawahara e colaboradores (2004) demonstraram que a liberação basal de noradrenalina no núcleo basolateral da amígdala está sob controle inibitório tônico da N/OFQ via receptores NOP. Ainda, que a administração periférica de J-113397, um antagonista não-peptídico competitivo do receptor NOP, induz um aumento na liberação basal de noradrenalina neste núcleo.

Em roedores, a administração endovenosa de ioimbina, antagonista α_2 adrenérgico, aumenta o conteúdo de noradrenalina no núcleo basolateral da amígdala e, em pacientes que sofrem de transtorno de pânico e de estresse pós-traumático, exacerba os sintomas da doença (Bremner et al., 1996a). Assim, a atividade tônica do sistema N/OFQ-receptor NOP no núcleo basolateral da amígdala pode exercer um efeito do tipo ansiolítico e a administração de um antagonista NOP promoveria um efeito do tipo ansiogênico. O efeito do tipo ansiolítico da administração de UFP-101 no ventrículo lateral no LTE somente

poderia ser explicado por esta última hipótese se o UFP-101 ou um metabólito atuasse como um agonista NOP.

Nesse sentido, Mahmoud e colaboradores (2010) recentemente demonstraram que o perfil farmacológico do UFP-101 varia com o nível de expressão do receptor NOP. Em condições fisiológicas, o UFP-101 bloqueia a inibição da corrente dos íons Ca^{2+} promovida pela N/OFQ e não apresenta atividade *per se* nos neurônios do gânglio estrelado de ratos Wistar. No entanto, quando o receptor NOP foi superexpresso nos neurônios do gânglio estrelado o UFP-101 apresentou propriedades de agonista parcial NOP, isto é, inibiu a corrente de íons Ca^{2+} da mesma forma que a N/OFQ. Nesse mesmo estudo, outros antagonistas NOP foram testados, como o Trap-101 e JTC-801, mas nenhum deles apresentou perfil semelhante aos da N/OFQ quando os receptores NOP foram superexpressos.

Além de apresentar perfis farmacológicos distintos em diferentes ensaios pré-clínicos, o agora definido agonista parcial NOP [$\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-NH})\text{Gly}^2$]N/OFQ(1-13)- NH_2 também demonstrou um perfil farmacológico diferente (agonista parcial, agonista pleno ou antagonista) quando a expressão do receptor NOP foi alterada (McDonald et al., 2003). Níveis elevados de expressão do receptor NOP foram encontrados em várias áreas do sistema nervoso central, como córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo, complexo amigdalóide, NDR, LC e medula espinhal (para revisão ver Mollereau e Mouledous (2000). Green e Devine (2009) demonstraram que animais expostos a condições estressantes, nesse caso ao teste de derrota social, apresentaram um aumento na expressão do RNAm do receptor NOP no núcleo basolateral e central da amígdala e no núcleo paraventricular do hipotálamo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na expressão do RNAm da preproN/OFQ. Vilpoux e colaboradores (2002) demonstraram que o tratamento crônico com paroxetina (10 mg/Kg, 1 x dia) por 4, 7 ou 21 dias aumentou significativamente (22-50%) a densidade dos sítios de ligação a $[3\text{H}]$ N/OFQ especificamente no NDR.

Em resumo, nossos resultados mostraram que os efeitos comportamentais produzidos pela administração central de UFP-101 no LTE parece ser proveniente de um fragmento C-terminal da degradação enzimática do peptídeo, pois a bestatina, um inibidor de aminopeptidase N preveniu o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 neste paradigma experimental.

Atualmente, os ISRS, por possuírem um amplo espectro de eficácia ansiolítica e por serem bem tolerados, são a droga de primeira escolha no tratamento dos transtornos de ansiedade (Dell'Osso et al.,

2010; Kent et al., 1998; Zoar e Westenberg, 2000). Resultados pré-clínicos demonstraram que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 produziu um efeito do tipo antidepressivo em roedores (Gavioli et al., 2003 e 2004). Além disso, o pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 4 x 100 mg/Kg dia, I.P.; inibidor da síntese de serotonina) preveniu esse efeito do UFP-101 em ratos, sugerindo que a neurotransmissão serotoninérgica pode estar envolvida no efeito do tipo antidepressivo promovido pelo UFP-101 (Gavioli et al., 2004).

Por esta razão, e porque a serotonina exerce um papel importante na ansiedade (para revisão ver Graeff, 2002), investigamos o envolvimento do sistema serotoninérgico e dos neurônios do NDR no efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE. Para isso, o UFP-101 1 nmol foi administrado no ventrículo lateral de animais pré-tratados com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA, 100 mg/Kg, I.P., 4 dias). O papel dos neurônios serotoninérgicos do NDR também foi investigado pela administração de UFP-101 intra-núcleo, pois o NDR contém uma grande quantidade de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos no sistema nervoso central (para revisão ver Hornung, 2003) e exerce um papel importante na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada e pânico (Deakin e Graeff, 1991).

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com PCPA preveniu o efeito do tipo ansiolítico da administração de UFP-101 1 nmol no ventrículo lateral quando os animais foram avaliados no LTE, indicando o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do tipo ansiolítico do UFP-101. Nenhum dos tratamentos alterou significativamente a latência para sair do braço aberto do LTE. Entretanto, o tratamento com PCPA+fluoxetina 20 mg/Kg prejudicou a locomoção no CA. Como esperado, o pré-tratamento com PCPA bloqueou o efeito do tipo ansiogênico da administração intraperitoneal de fluoxetina 20 mg/Kg.

A administração de UFP-101 no NDR diminuiu, de maneira dose-dependente, a latência para sair do braço fechado do LTE, indicando um efeito do tipo ansiolítico. A latência para sair do braço aberto do LTE, bem como o número de cruzamentos e comportamentos de levantar não foram alterados significativamente por nenhuma das doses de UFP-101.

As primeiras evidências do envolvimento da serotonina na ansiedade foram obtidas em animais de laboratório submetidos a testes de conflito no início dos anos 70. Nesses experimentos, verificou-se que drogas que reduziam a ação da serotonina liberavam o comportamento

punido por choque elétrico, enquanto as que aumentavam, acentuavam a inibição comportamental induzida pela punição. Como os ansiolíticos benzodiazepínicos reduzem a taxa de renovação da serotonina, Wise e colaboradores (1972) formularam a hipótese de que a serotonina medeia os efeitos da punição através da estimulação de regiões prosencefálicas, como a amígdala e a formação hipocampal, e mesencefálicas. Em outras palavras, a estimulação do sistema serotoninérgico desempenharia um papel ansiogênico (Graeff, 2002). Entretanto, diversos experimentos realizados para testar este modelo comprovaram a hipótese de que a serotonina seria ansiogênica no prosencéfalo, mas não em regiões mesencefálicas. Foi demonstrado que a estimulação de receptores serotoninérgicos na SCPD, por meio de agonistas farmacológicos, inibia a fuga induzida pela estimulação desta região. Admitindo-se que a fuga seja expressão de ansiedade, concluiu-se que a serotonina exerce um papel ansiolítico na SCPD, ao contrário do que havia sido postulado anteriormente (Graeff, 2002).

Para conciliar esses resultados aparentemente contraditórios, Deakin e Graeff (1991) propuseram uma hipótese dual da ação da serotonina sobre mecanismos de defesa. Segundo esses pesquisadores, a via ascendente originada no NDR e que inerva a amígdala e o córtex frontal atua facilitando reações de esquiva que ocorrem como resposta a um perigo potencial ou distal. Devido ao fato destas estratégias comportamentais se encontrarem amplamente baseadas no aprendizado, poderiam estar relacionadas à ansiedade antecipatória ou condicionada e à ansiedade generalizada. Por outro lado, a via periventricular que parte do NDR e que inerva a SCPD inibiria as reações inatas de fuga ou luta em resposta a um perigo proximal, presumidamente relacionada ao transtorno do pânico. Ou seja, de acordo com a hipótese de Deakin e Graeff (1991) a serotonina facilita a ansiedade, porém inibe o pânico.

Para testar essa hipótese, um novo modelo animal de ansiedade, o LTE foi desenvolvido (Graeff et al., 1993; Viana et al., 1994). O LTE permite a medida, no mesmo animal, da esquiva inibitória (medo condicionado) e fuga (medo incondicionado), relacionadas à ansiedade generalizada e ao pânico, respectivamente (Deakin e Graeff, 1991; Graeff et al., 1993; Viana et al., 1994).

Os resultados da validação farmacológica do LTE demonstraram que os fármacos relacionados à serotonina buspirona (agonista 5-HT_{1A}) e ritanserina (antagonista 5-HT_{2A/2C}), que na clínica melhoram os sintomas da ansiedade generalizada, prejudicaram a latência para sair do braço fechado (esquiva inibitória), mas não alteraram a latência para sair do braço aberto (fuga). Por outro lado, o

tratamento crônico com os fármacos antidepressivos imipramina (inibidor da recaptação de 5-HT e noradrenalina) e paroxetina (inibidor da recaptação de 5-HT), que exercem um efeito ansiolítico e panicolítico na clínica, prejudicaram a esquia inibitória e prolongaram a fuga no LTE (para revisão ver Zangrossi et al., 2001; Beijamini e Andreatini, 2003).

Poltronieri e colaboradores (2003), na tentativa de estender a validação farmacológica do LTE para os inibidores da recaptação de serotonina fluoxetina (5, 10 e 15 mg/Kg, I.P.) e clomipramina (3, 10 e 30 mg/Kg, I.P.), demonstraram em ratos que os tratamentos agudos com esses fármacos não alteraram significativamente as latências para sair do braço fechado e aberto do LTE. No entanto, os tratamentos crônicos com estes fármacos prejudicaram a latência para sair do braço aberto do LTE, indicando um efeito do tipo panicolítico. A latência para sair do braço fechado, bem como a atividade locomotora no CA não foram afetadas por nenhum tratamento.

Entretanto, nossos resultados no LTE com o tratamento agudo com fluoxetina (15 e 20 mg/Kg, I.P.; Apêndice I) demonstraram um aumento significativo na latência para sair do braço fechado do LTE, indicando um efeito do tipo ansiogênico. A latência para sair do braço aberto e a atividade locomotora no CA não foram afetadas.

Nossos resultados corroboram em parte os de Poltronieri e colaboradores (2003), onde a latência de fuga e a atividade locomotora parecem não ser influenciadas pelo tratamento agudo com fluoxetina, enquanto a latência de esquia inibitória pode ou não sofrer influência do tratamento agudo com fluoxetina. Os motivos para essa divergência entre os resultados do tratamento agudo com fluoxetina na esquia inibitória no LTE não são claros. De acordo com os resultados encontrados na clínica com o tratamento agudo com ISRS (Dell'Osso et al., 2010; Kent et al., 1998; Zoar e Westenberg, 2000), era esperado um efeito do tipo ansiogênico para esse fármaco, pois os pacientes podem ter os sintomas de ansiedade exacerbados nas primeiras semanas de tratamento.

Gomes e colaboradores (2009) demonstraram em camundongos que a administração intraperitoneal aguda de fluoxetina (20 e 40 mg/Kg) facilitou a aquisição da tarefa de esquia inibitória, enquanto o tratamento crônico de fluoxetina (40 mg/Kg) prejudicou esta medida comportamental, sugerindo que os tratamentos agudo e crônico com fluoxetina apresentaram um efeito do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no LTE. Tudo isso mostra que nossos resultados com

fluoxetina no LTE vão de encontro aos dados da literatura e contribuem para a validação farmacológica do LTE.

Apesar de nossos resultados e os de Poltronieri e colaboradores (2003) terem demonstrado que a latência de fuga não foi alterada com o tratamento agudo com fluoxetina, na bateria de teste de defesa do camundongo o tratamento agudo com fluoxetina (5 mg/Kg) facilitou a resposta de fuga, indicando um efeito do tipo panicogênico (Blanchard et al., 1997). Gomes e colaboradores (2009) também investigaram os efeitos do tratamento agudo e crônico com fluoxetina na latência para sair do braço aberto do LTE em camundongos. Estes pesquisadores encontraram um prejuízo na latência para sair do braço aberto do LTE no tratamento agudo e uma facilitação no tratamento crônico. Entretanto, a resposta de fuga para camundongos precisa ser melhor caracterizada, pois camundongos não exibem comportamento tipo fuga como uma resposta imediata quando colocados no braço aberto (Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza, 2004). Uma redução na latência de fuga, que em ratos pode ser interpretada como um efeito panicogênico/pró-aversivo, em camundongos tem sido interpretada como um efeito anti-aversivo. Para suportar essa afirmação Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) demonstraram que compostos ansiolíticos, como a buspirona, facilitaram a fuga dos braços abertos, enquanto compostos ansiogênicos, como a cafeína, prejudicaram a fuga dos braços abertos.

Na hipótese de Deakin e Graeff (1991) o NDR exerce um papel importante na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada e pânico. Diferentes estudos realizados no LTE têm confirmado o envolvimento do NDR nesses comportamentos (Graeff et al., 1996; Sena et al., 2003; Viana et al., 1997). Em um deles, Graeff e colaboradores (1996) demonstraram que a administração de ácido cálnico (60 pmol, um aminoácido excitatório) no NDR aumentou a latência para sair do braço fechado e aberto do LTE, indicando um efeito do tipo ansiogênico e panicolítico, respectivamente. Em um experimento posterior, essa mesma dose de ácido cálnico no NDR promoveu um aumento significativo na liberação de serotonina na amígdala e na SCPD (Viana et al., 1997). Efeito semelhante ao do ácido cálnico foi encontrado após a administração de WAY-1000635, um antagonista 5-HT_{1A}, no NDR em ratos submetidos ao LTE (Pobbe and Zangrossi, 2005). Em contrapartida, a administração de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A}, no NDR diminuiu a latência para sair do braço fechado e aberto do LTE, indicando efeitos do tipo ansiolítico e panicogênico, respectivamente (Sena et al., 2003). Efeito semelhante ao

do 8-OH-DPAT foi encontrado 14 dias após a lesão seletiva dos neurônios serotoninérgicos do NDR com 5,7-dihidroxitriptamina no LTE (Sena et al., 2003).

Em relação ao sistema N/OFQ-receptor NOP e o NDR, Nazzaro e colaboradores (2010) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a N/OFQ reduz de maneira dose-dependente a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos do NDR de ratos não estressados e estressados (15 min de natção 24 h ou 1 h antes do registro), sendo que em ratos estressados o efeito inibitório da N/OFQ foi potencializado. *In vitro* o UFP-101 não alterou a taxa de disparo dos neurônios do NDR, mas deslocou para a direita a curva dose-resposta da N/OFQ de ratos não estressados e estressados, o que mostra que ambos os peptídeos competem pela ligação ao receptor NOP. Nos experimentos *in vivo* a dose mais alta de N/OFQ (0,016 nmol) inibiu a taxa de disparo dos neurônios do NDR, com uma duração maior que 15 min, porém o UFP-101 não foi utilizado nesta série de experimentos. Tao e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de N/OFQ no NDR diminui de maneira dose-dependente o efluxo de serotonina nessa área, enquanto a administração do antagonista peptídico NOP [Nphe^1]N/OFQ(1-13)-NH₂ (300 μM) aumenta, em animais que se moviam livremente.

A partir desses estudos, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar nossos resultados encontrados com a administração de UFP-101 no NDR de ratos submetidos ao LTE. Uma delas, dando seqüência aos nossos resultados prévios, seria a de que um fragmento C-terminal do UFP-101, atuando como agonista NOP, poderia promover uma diminuição na taxa de disparo dos neurônios do NDR a exemplo da N/OFQ e, conseqüentemente, diminuir o conteúdo de serotonina na amígdala e córtex frontal. Os estudos de Nazzaro e colaboradores (2010) foram realizados somente *in vitro*, condições nas quais a atividade neuronal, bem como a concentração das peptidases endógenas, podem estar diferentes das condições fisiológicas. Assim, a realização de experimentos *in vivo*, como os aqui descritos, poderia ajudar a esclarecer esse ponto.

Outra hipótese seria de que o UFP-101 poderia aumentar o efluxo de serotonina no NDR, como o antagonista peptídico NOP [Nphe^1]N/OFQ(1-13)-NH₂. Os neurônios serotoninérgicos do NDR estão sob controle inibitório tônico da serotonina endógena, via receptores 5-HT_{1A} (Haddjeri et al., 2004; Mlinar et al., 2005). Tanto a N/OFQ como o receptor NOP estão presentes em neurônios serotoninérgicos do NDR (Le Maître et al., 2005). Assim, a administração de UFP-101 no NDR

poderia potencializar o efeito inibitório da serotonina endógena na taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos do NDR.

O NDR contém neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos. Os neurônios serotoninérgicos no NDR fazem conexões aferentes e eferentes com distintas regiões do prosencéfalo pertencentes ao sistema límbico (para revisão ver Hornung, 2003). Mlinar e colaboradores (2005) sugeriram que neurônios serotoninérgicos do NDR representam uma população heterogênea considerando sua susceptibilidade à auto-inibição pela serotonina endógena. Este fato poderia ajudar a explicar também porque o UFP-101 alterou somente a latência para sair do braço fechado do LTE. Nesse caso, a população de neurônios que inerva a amígdala e o córtex frontal poderia ser mais susceptível aos efeitos inibitórios da serotonina endógena, do que a população de neurônios que inerva a SCPD. No entanto, esta hipótese deve ser testada.

Uma alternativa, a faixa de doses de UFP-101 utilizada neste experimento não é a ideal. O efeito encontrado com a administração de UFP-101 no NDR na tarefa de esQUIVA inibitória do LTE foi dose-dependente, isto é, quanto maior a dose, maior a redução na EsQUIVA 2. Desta forma, não temos qualquer garantia de que doses diferentes das utilizadas poderiam alterar a latência de fuga, em especial doses maiores.

Já a administração de PCPA não alterou nenhuma das medidas avaliadas no LTE. Era esperado, segundo a teoria de Deakin e Graeff (1991), um prejuízo na esQUIVA inibitória no LTE (efeito do tipo ansiolítico), como resultado de uma redução no conteúdo de 5-HT no córtex frontal e na amígdala, e/ou um efeito do tipo panicogênico, proveniente de uma redução no conteúdo de serotonina na matéria cinzenta periaquedutal. A este respeito, Kornum e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com PCPA (200 mg/Kg, 4 dias) diminuiu o conteúdo de serotonina e do seu metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no cérebro de ratos Sprague-Dawley igualmente em 95%, em relação aos animais tratados com Salina. Nesse mesmo estudo, também foi demonstrado, através da técnica de imunohistoquímica, uma distribuição distinta da serotonina remanescente, com uma completa depleção no córtex, hipocampo, hipotálamo, amígdala, estriado, núcleo *accumbens* e septo lateral. Forte marcação para serotonina ainda permaneceu na área tegmental ventral, eminência média, feixe prosencefálico medial e nos NDR e mediano da rafe (Kornum et al., 2006). Assim, essa forte marcação para serotonina no NDR após o tratamento com PCPA pode ter influenciado ou ser um dos motivos para os resultados obtidos não serem os esperados no LTE.

Os resultados encontrados com ratos Sprague-Dawley podem ser extrapolados para ratos Wistar, pois o número de células imunorreativas a serotonina nos NDR e mediano da rafe foram menores nos ratos Wistar machos tratados com PCPA (100 mg/Kg, 4 dias) quando comparados aos tratados com salina (Ito et al., 2010). Além disso, Scholl e colaboradores (2010) demonstraram que os níveis de serotonina no cérebro de ratos Wistar não diferem dos de ratos Sprague-Dawley, mas a linhagem Wistar apresentou níveis reduzidos do metabólito 5-HIAA em várias regiões cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal medial, LC, NDR e sub-regiões do hipocampo, hipotálamo e da amígdala, quando comparados à linhagem Sprague-Dawley (Scholl et al., 2010). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre estas linhagens nos comportamentos avaliados no CA, LCE e no teste do nado forçado (McDermott e Kelly, 2008; Tejani-Butt et al., 2003), sugerindo que essa diferença na taxa de renovação ou metabolismo da serotonina entre essas duas linhagens de ratos não tem consequência funcional nos comportamentos emocionais.

Vários estudos utilizando diferentes testes experimentais de ansiedade, a exceção do LTE, como o LCE e a caixa claro-escuro, têm mostrado que o tratamento com PCPA promove um efeito do tipo ansiolítico em roedores (Artaiz et al., 1998; Gibson et al., 1994; Kshama et al., 1990; Treit et al., 1993). Por outro lado, Pinheiro e colaboradores (2007) descreveram que os resultados obtidos na tarefa de esQUIVA inibitória no LTE são sensíveis a drogas ansiolíticas e ansiogênicas que agem nos receptores serotoninérgicos, como os índices espaços-temporais de ansiedade do LCE, mas tendem a ser mais consistentes no LTE que no LCE, fato que chama ainda mais a atenção para a ausência de resultados com o tratamento com PCPA no LTE. Entretanto, parece que as alterações nas reações defensivas avaliadas no LTE estão restritas a mudanças no conteúdo de serotonina no córtex frontal, na amígdala e na SCPD. Colocado dessa forma, nossos resultados com a administração de PCPA corroboram com a hipótese de Deakin e Graeff (1991) para o papel dual da serotonina na ansiedade, pois o pré-tratamento com PCPA deve ter alterado a concentração de serotonina em diversas áreas do sistema nervoso central e não somente no córtex frontal, na amígdala e na SCPD.

Outros dois pontos interessantes foram o prejuízo motor observado no CA para os animais tratados com PCPA+fluoxetina e a maior latência, embora não significativa, para sair do braço aberto do LTE dos animais pré-tratados com PCPA. Acreditamos que esses resultados foram provenientes de um prejuízo motor residual do PCPA,

embora nossos resultados não tenham demonstrado nenhuma alteração significativa na atividade locomotora para os animais tratados com PCPA no CA. A este respeito, não há um consenso em relação aos efeitos do tratamento com PCPA na atividade locomotora. Diferentes trabalhos das décadas de 60 e 70 demonstraram que a atividade locomotora espontânea pode aumentar, diminuir, ou ainda não sofrer qualquer alteração após o tratamento com PCPA. Na metade dos anos 90, Dringenberg e colaboradores (1995) demonstraram que o tratamento com PCPA (150, 500 e 1000 mg/Kg, 2 dias) reduziu significativamente, e de maneira dose dependente, a atividade locomotora no CA em ratos. Recentemente, Tejada e colaboradores (2011) demonstraram que a administração intraperitoneal de PCPA (300 mg/Kg, 2 dias) reduziu significativamente a atividade locomotora de rolas (*Streptopelia risoria*), estendendo os efeitos prejudiciais do PCPA na locomoção para outras espécies de animais.

Em resumo, nossos resultados indicam que o sistema serotoninérgico parece exercer um papel importante no efeito do tipo ansiolítico produzido pelo UFP-101, pois o pré-tratamento com PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, preveniu esse efeito e a administração de UFP-101 intra NDR, que contém grandes quantidades de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos, também apresentou o mesmo efeito do tipo ansiolítico da injeção no ventrículo lateral no LTE.

Por fim, resolvemos investigar o envolvimento dos neurônios noradrenérgicos do LC no efeito do tipo ansiolítico da administração no ventrículo lateral de UFP-101, uma vez que este núcleo está implicado nas respostas ao estresse e ansiedade (Berridge e Waterhouse, 2003; Bremner et al., 1996 a,b). O envolvimento do LC na ansiedade foi primeiramente sugerido por Redmond e colaboradores (1976), ao observar que a estimulação elétrica deste núcleo em macacos resultava no aparecimento de determinados comportamentos similares aos observados em situações de medo ou ameaça. Desde então, estudos pré-clínicos e clínicos têm suportado o envolvimento do sistema noradrenérgico (LC) nas respostas de medo, ansiedade e/ou estresse.

No sistema nervoso central os corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos se limitam a pequenos agrupamentos na ponte e no bulbo (grupos A1-A7). O LC (grupo A6) é o maior núcleo noradrenérgico e projeta axônios ascendentes para o tálamo, o hipotálamo, o sistema límbico (principalmente para a amígdala e o hipocampo) e para todo o córtex cerebral (Aston-Jones et al., 1985). O LC está implicado em uma variedade de funções fisiológicas além das respostas ao estresse e ansiedade, incluindo o ciclo sono-vigília, atenção

e alerta e processos cognitivos (Berridge e Waterhouse, 2003; Bremner et al., 1996 a,b).

Animais de laboratório quando expostos a estímulos aversivos ou estressantes, como o estresse de imobilização, apresentam um aumento na taxa de renovação da noradrenalina no LC, no córtex, no hipocampo, no hipotálamo e na amígdala (Bremner et al., 1996a). Tanaka e colaboradores (2000) sugerem que o mecanismo básico de ação das drogas ansiolíticas que atuam no complexo receptor GABAA/benzodiazepínico, como o diazepam, pode ser a atenuação na liberação aumentada de noradrenalina no hipotálamo, amígdala e LC, em animais expostos a estímulos aversivos. A exposição a estímulos aversivos também promove um aumento na expressão de c-Fos em núcleos noradrenérgicos do tronco cerebral e um aumento na atividade de disparo dos neurônios do LC (Pezzone et al., 1993). Além disso, as respostas ansiogênicas observadas em roedores após a retirada de drogas de abuso, como a cocaína e a morfina, é bloqueada pela administração de antagonistas β -adrenérgicos, como propranolol e atenolol (Harris e Aston-Jones, 1993).

Evidências clínicas suportam a hipótese que o LC está envolvido nas respostas relacionadas à ansiedade, *e.g.*, pacientes que sofrem de distúrbio do pânico ou de distúrbio de estresse pós-traumático apresentam alívio nos sintomas da doença após receberem clonidina (agonista $\alpha 2$ -adrenérgico, e que suprime a atividade de disparo dos neurônios do LC) (Bremner et al., 1996b; Boehnlein e Kinzie, 2007). Por outro lado, pacientes que receberam ioimbina (antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico, e que bloqueia a ação da noradrenalina nos auto-receptores inibitórios do LC) tiveram os sintomas da doença exacerbados (Bremner et al., 1996b).

Em relação ao sistema N/OFQ-receptor NOP e as vias noradrenérgicas endógenas, alguns resultados experimentais demonstraram que o LC apresenta altos níveis de expressão do receptor NOP e do RNAm do receptor NOP (Anton et al., 1996; Florin et al., 2000; Fukuda et al., 1994). Agonistas do receptor NOP diminuem a atividade elétrica de neurônios noradrenérgicos localizados no LC (Connor et al., 1996; 1999) e a liberação de noradrenalina no córtex cerebral de roedores *in vitro* (Marti et al., 2003; Schlicker et al., 1998; Siniscalchi et al., 2002). Estudos *in vivo* demonstraram que a ativação do receptor NOP no LC reduz a liberação de noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos (Okawa et al., 2001). Além disso, a liberação basal de noradrenalina na amígdala basolateral está sob controle inibitório tônico da N/OFQ (quando injetada neste núcleo, Kawahara et al., 2004).

Roozendaal e colaboradores (2007) demonstraram que o sistema N/OFG-receptor NOP interage com mecanismos noradrenérgicos no núcleo basolateral da amígdala na consolidação da memória de uma tarefa de esquivas inibitória em ratos.

Apesar de boa parte desses resultados indicar a possibilidade de agonistas NOP, e não antagonistas, modularem as vias noradrenérgicas endógenas como um dos mecanismos responsáveis pelo efeito do tipo ansiolítico desses ligantes, resolvemos investigar o papel dos neurônios noradrenérgicos do LC no efeito do tipo ansiolítico da administração de UFP-101 no ventrículo lateral, pois trabalhamos com a hipótese de um fragmento C- terminal do UFP-101 atuar como agonista NOP. Para isso, ratos Sprague-Dawley foram tratados no ventrículo lateral com UFP-101 (0,3 e 1 nmol) e a atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC foi registrada. As doses de UFP-101 utilizadas nesse experimento foram escolhidas a partir de uma curva dose-resposta realizada no TEE. O TEE, além de permitir a avaliação do efeito da administração no ventrículo lateral de UFP-101 em outro teste de ansiedade, também serviu para avaliar o efeito de doses menores (0,1 e 0,3 nmol) que as utilizadas no LTE de UFP-101.

Em condições naturais e em laboratório, ratos e camundongos espontaneamente utilizam material de forragem para cobrir uma fonte de estímulo aversivo, como um objeto com o odor do predador ou um objeto eletrificado. A administração de fármacos com atividade ansiolítica ou antidepressiva, como o diazepam e a fluoxetina, reduzem esse comportamento (para revisão ver De Boer e Koolhaas, 2003).

Os roedores também utilizam material de forragem para cobrir objetos inofensivos, *e.g.*, *pellets* de ração ou esferas de vidro; sendo questionada a natureza defensiva de tal comportamento. A esse respeito, alguns pesquisadores sugerem que no TEE as esferas de vidro podem pertencer à categoria de medo inato a estímulos aversivos em virtude da sua “novidade”; e a emissão do comportamento de esconder as esferas pode ser vista como uma resposta apropriada, pois elimina a fonte de estímulo aversivo. Alternativamente, outros estudos sugerem que o comportamento de esconder esferas não é necessariamente estimulado pela “novidade”, mas está associado ao comportamento de escavar repetidamente e reflete mais um comportamento do tipo obsessivo-compulsivo (Broekkamp et al., 1986; Njung’e e Handley, 1991; Thomas et al., 2009).

Entretanto, enquanto a natureza defensiva do comportamento de esconder esferas é ainda ativamente debatida, o TEE tem sido utilizado para o *screening* de compostos ansiolíticos. Realmente, o tratamento

agudo com fármacos ansiolíticos em uso na clínica tais como o diazepam, buspirona e os antidepressivos como os ISRS, os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina e os tricíclicos reduziram o número de esferas escondidas (Borsini et al., 2002; Hayashi et al., 2010; Nicolas et al., 2006; Njung'e e Handley, 1991). Entretanto, os resultados encontrados com o tratamento crônico com os antidepressivos tricíclicos são inconsistentes, com uma diminuição no número de esferas escondidas ou nenhuma alteração. De qualquer maneira o TEE é um dos poucos modelos de transtornos de ansiedade que são sensíveis a maioria dos antidepressivos (Borsini et al., 2002).

Nossos resultados no TEE demonstraram que o UFP-101, nas doses de 0,3, 1 e 3 nmol, reduziu significativamente o número de esferas escondidas, indicando um efeito do tipo ansiolítico e confirmando nossa observação anterior no LTE. Gavioli e colaboradores (2007) demonstraram que o número de esferas escondidas não foi alterado significativamente em camundongos NOP^{-/-} quando comparados a camundongos NOP^{+/+}. Por outro lado, Nicolas e colaboradores (2006) demonstraram que a administração intraperitoneal do agonista não-peptídico NOP Ro64-6198 1 mg/Kg em camundongos reduziu significativamente o número de esferas escondidas. Dessa forma, o perfil de resposta encontrado no TEE após o tratamento com UFP-101 foi semelhante ao do agonista NOP Ro64-6198, contribuindo para a hipótese de um metabólito da degradação enzimática do UFP-101 atuar como agonista NOP.

Entretanto, as doses maiores de UFP-101 (1 e 3 nmol) reduziram significativamente a distância total percorrida no CA. Como visto anteriormente, diferentes estudos demonstraram que o bloqueio farmacológico ou a deleção gênica do receptor NOP não afeta a locomoção espontânea de roedores (Calo' et al., 2002 e 2005; Gavioli et al., 2003 e 2007; Nischi et al., 1997). Nossos resultados com ratos Wistar também não demonstraram nenhuma diferença significativa no CA após o tratamento com essas doses de UFP-101. Além disso, no teste do CA nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as linhagens de ratos Wistar e Sprague-Dawley (McDermott e Kelly, 2008; Tejani-Butt et al., 2003). Dessa forma, os motivos para esse prejuízo na atividade locomotora não são claros e precisam ser mais bem estudados.

Em relação à atividade elétrica dos neurônios do LC, nossos resultados demonstraram que após a administração de UFP-101 (0,3 e 1 nmol) a taxa de disparo dos neurônios do LC foi inibida, indicando a possibilidade do UFP-101 modular a atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC como um dos mecanismos responsáveis pelo

efeito do tipo ansiolítico, pois fármacos com atividade ansiolítica tais como os benzodiazepínicos (Grant et al., 1980) e os antidepressivos (tratamento agudo e crônico; Berrosco e Micó, 2007; Grant e Weiss, 2001; West et al., 2009) diminuem a taxa de disparo dos neurônios do LC. Entretanto, estes dados contrariam os estudos *in vitro* de Gavioli e colaboradores (2004) que demonstraram que a N/OFQ hiperpolariza os neurônios do LC, da mesma forma que a Met-enkefalina e o UK-14304, um agonista α_2 adrenérgico, enquanto o UFP-101 não apresenta efeito *per se*, mas reduz o efeito hiperpolarizante promovido pela N/OFQ.

No entanto, a inibição na taxa de disparo dos neurônios do LC, encontrada após a administração de UFP-101 (0,3 e 1 nmol), foi prevenida pelo tratamento endovenoso com naloxona, embora o efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 0,3 nmol no TEE não foi prevenido com o pré-tratamento com Naloxona 1 mg/Kg. A Naloxona 1 mg/Kg não alterou *per se* o índice de ansiedade avaliado no TEE e a atividade elétrica dos neurônios do LC, corroborando com dados da literatura (Berrosco e Micó, 2007; Britton e Southerland, 2001).

A atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC também pode ser regulada por receptores μ -opiódicos, e a ativação desses receptores promove uma redução progressiva na taxa de disparo desses neurônios (Egan et al., 1983). Nossos resultados do teste de padronização da técnica de registro dos neurônios do LC com Morfina (150 – 4800 μ g/Kg; Apêndice III) mostram justamente isso. Diferentes estímulos podem alterar a atividade elétrica dos neurônios do LC, *e.g.*, hipotensão, distensão da bexiga e pressão da pata traseira de um rato podem promover um aumento na taxa de disparo dos neurônios do LC (Stanford, 1995). Entretanto, um efeito secundário na atividade elétrica dos neurônios do LC proveniente de uma alteração na pressão arterial pode ser descartado, pois nossos resultados demonstraram que a administração no ventrículo lateral de UFP-101 não alterou significativamente a pressão arterial durante o registro dos potenciais de ação do LC, corroborando com dados prévios da literatura (Buermeister e Kapusta, 2007).

Desta forma, nossos resultados indicam que a inibição na taxa de disparo dos neurônios do LC promovida pelo UFP-101 ocorre via receptores opioidérgicos e que a modulação na atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos do LC não deve ser um dos mecanismos responsáveis pelo efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 (nossos resultados no TEE com Naloxona+UFP-101 contribuem para essa conclusão). Parte desses resultados corrobora com outros achados de Gavioli e colaboradores (2004) que haviam demonstrado que o pré-

tratamento com *N*-(2-cloroetil)-*N*-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4; 50 mg/kg, I.P.), substância neurotóxica para os neurônios noradrenérgicos, não preveniu o efeito do tipo antidepressivo do UFP-101 em camundongos no teste de natação forçada, descartando o envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito do tipo antidepressivo do UFP-101. O UFP-101 pode atuar em outros processos comportamentais e fisiológicos modulados pelo LC, diferentes dos relacionados com medo e ansiedade, como o ciclo sono-vigília, atenção e alerta, além da dor (Berridge e Waterhouse, 2003; Berroscoso e Micó, 2007; Bremner et al., 1996 a,b), e que merecem ser estudados.

Por outro lado, esses resultados indiretamente corroboram a hipótese de um fragmento C-terminal do UFP-101 ser o responsável pelo seu efeito, como observado anteriormente com a prevenção do efeito do tipo ansiolítico do UFP-101 no LTE com bestatina. Ainda, os resultados estimulam a discussão do(s) metabólito(s) atuar(em) em outros receptores que não o NOP, nesse caso os receptores opioidérgicos clássicos.

6. CONCLUSÕES

- Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a administração central de UFP-101, caracterizado até então como antagonista peptídico competitivo do receptor NOP, apresenta um efeito do tipo ansiolítico em dois testes de ansiedade – o labirinto em T elevado e o teste de esconder esferas;
- Os efeitos comportamentais produzidos pela administração no ventrículo lateral de UFP-101 no labirinto em T elevado parece ser proveniente de um fragmento C-terminal da degradação enzimática do peptídeo e ocorre via receptor NOP, pois um inibidor de aminopeptidase N (bestatina) e o agonista endógeno do receptor NOP (N/OFQ) preveniram, respectivamente, o efeito do tipo ansiolítico do peptídeo observado neste paradigma experimental;
- Nossos resultados indicam que o sistema serotoninérgico, mas não o noradrenérgico, parece exercer um papel importante no efeito do tipo ansiolítico produzido pelo UFP-101. Além disso, sugerem que um fragmento C-terminal da degradação enzimática do peptídeo pode atuar como agonista NOP e em receptores opioidérgicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION: **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, Fourth Edition, Text Revision. Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.

ANDRADE, L.; WALTERS, E.E.; GENTIL, V.; LAURENTI, R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil; **Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol**; 37:316-325, 2002.

ANTON, B.; FEIN, J.; TO, T.; LI, X.; SILBERSTEIN, L.; EVANS, C.J. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. **J Comp Neurol**; 368:229-251, 1996.

DE ARAÚJO, J.E.; HUSTON, J.P.; BRANDÃO, M.L. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Exp Brain Res**. 123:84-89, 1998.

ARGYROPOULOS, S.V.; SANDFORD, J.J.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol Ther**; 88:213-227, 2000.

ARTAIZ, I.; ZAZPE, A.; DEL RÍO, J. Characterization of serotonergic mechanisms involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light-dark test in mice. **Behav Pharmacol**; 9:103-112, 1998.

ASTON-JONES, G.; FOOTE, S.L.; BLOOM F.E. Anatomy and physiology of locus coeruleus neurons: functional implications. In ZIEGLER, M., LAKE, C.R. (Ed.), **Norepinephrine: Frontiers of Clinical Neuroscience**, vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, p. 92-11, 1984.

BALDWIN, D.S.; ANDERSON, I.M.; NUTT, D.J.; BANDELOW, B.; BOND, A.; DAVIDSON, J.R.; DEN BOER, J.A.; FINEBERG, N.A.; KNAPP, M.; SCOTT, J.; WITTCHEN, H.U. Evidence-based guideline for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol**; 19:567-596, 2005.

BEIJAMINI, V. e ANDREATINI, R. Effects of Hypericum perforatum and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. **Pharmacol Res**; 48:199-207, 2003.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H.J.; WESTENBERG, H.G. Glutamate and anxiety. **Eur Neuropsychopharmacol**; 14:175-183, 2004.

BERRIDGE, C.W. e WATERHOUSE, B.D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Res Brain Res Rev**; 42:33-84, 2003.

BERROCOSO, E. e MICO, J.A. In vivo effect of venlafaxine on locus coeruleus neurons: role of opioid, alpha(2)-adrenergic, and 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. **J Pharmacol Exp Ther**; 322:101-107, 2007.

BLANCHARD, D.C. e BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D.J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, p.63-80, 2008.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur J Pharmacol**; 463:97-116, 2003.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav Rev**; 21:783-789, 1997.

BLEICKARDT, C.J.; MULLINS, D.E.; MACSWEENEY, C.P.; WERNER, B.J.; POND, A.J.; GUZZI, M.F.; MARTIN, F.D.; VARTY, G.B.; HODGSON, R.A. Characterization of the V1a antagonist, JNJ-17308616, in rodent models of anxiety-like behavior. **Psychopharmacology (Berl)**; 202:711-718, 2009.

BOEHNLEIN, J.K. e KINZIE, J.D. Pharmacologic reduction of CNS noradrenergic activity in PTSD: the case for clonidine and prazosin. **J Psychiatr Pract**; 13:72-78, 2007.

BOOM, A.; MOLLEREAU, C.; MEUNIER, J.C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.; VANDERHAEGHEN, J.J.; SCHIFFMANN, S.N.; Distribution of the nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. **Neuroscience**; 91:991-1007, 1999.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**; 163:121-141, 2002.

BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia – as bases fisiológicas do comportamento**; SP; Ed. Atheneu, p. 107-149, 2001.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev Bras Psiquiatr**; 25:36-41, 2003.

BREMNER, J.D.; KRYSTAL, J.H.; SOUTHWICK, S.M.; CHARNEY, D.S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. **Synapse**; 23:28-38, 1996a.

BREMNER, J.D.; KRYSTAL, J.H.; SOUTHWICK, S.M.; CHARNEY, D.S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies. **Synapse**; 23:39-51, 1996b.

BRITTON, K.T. e SOUTHERLAND, S. Naloxone blocks 'anxiolytic' effects of neuropeptide Y. **Peptides**; 22:607-612, 2001.

BROEKKAMP, C.L.; RIJK, H.W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K.L. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol**; 126:223-229, 1986.

BROQUA, P.; WETTSTEIN, J.G.; ROCHER, M.N.; GAUTHIER-MARTIN, B.; JUNIEN, J.L. Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures. **Behav Pharmacol**; 6:215-222, 1995.

BURMEISTER, M.A. e KAPUSTA, D.R. Centrally administered nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) evokes bradycardia, hypotension, and diuresis in mice via activation of central N/OFQ peptide receptors. **J Pharmacol Exp Ther**; 322:324-331, 2007.

BURT, D.R. Reducing GABA receptors. **Life Sci**; 43:1741-1758, 2003.

CALO', G.; BIGONI, R.; RIZZI, A.; GUERRINI, R.; SALVADORI, S.; REGOLI, D. Nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. **Peptides**; 21:935-947, 2000a.

CALO', G.; GUERRINI, R.; BIGONI, R.; RIZZI, A.; MARZOLA, G.; OKAWA, H.; BIANCHI, C.; LAMBERT, D.G.; SALVADORI, S.; REGOLI, D. Characterization of [Nphe(1)]nociceptin(1-13)NH(2), a new selective nociceptin receptor antagonist. **Br J Pharmacol**; 129:1183-1193, 2000b.

CALO', G.; GUERRINI, R.; RIZZI, A.; SALVADORI, S.; REGOLI, D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. **Br J Pharmacol**; 129:1261-1283, 2000c.

CALO', G.; GUERRINI, R.; RIZZI, A.; SALVADORI, S.; BURMEISTER, M.; KAPUSTA, D.R.; LAMBERT, D.G.; REGOLI, D. UFP-101, a peptide

antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. **CNS Drug Rev**;11:97-112, 2005.

CALO', G.; RIZZI, A.; RIZZI, D.; BIGONI, R.; GUERRINI, R.; MARZOLA, G.; MARTI, M.; MCDONALD, J.; MORARI, M.; LAMBERT, D.G.; SALVADORI, S.; REGOLI, D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH2, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. **Br J Pharmacol**; 136:303-311, 2002.

CARR, G.V. e LUCKI, I. Comparison of the kappa-opioid receptor antagonist DIPPA in tests of anxiety-like behavior between Wistar Kyoto and Sprague Dawley rats. **Psychopharmacology**; 2:295-302, 2010.

CARVALHO, M.C.; MASSON, S.; BRANDAO, M.L.; DE SOUZA SILVA, M.A. Anxiolytic-like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. **Peptides**; 29:1191-1200, 2008.

CARVALHO-NETTO, E.F. e NUNES-DE-SOUZA, R.L. Use of elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behav Brain Res**; 148:119-132, 2004.

CEDARBAUM, J.M. e AGHAJANIAN, G.K. Activation of locus coeruleus neurons by peripheral stimuli: modulation by a collateral inhibitory mechanism. **Life Sci**; 23:1383-1392, 1978.

CEDARBAUM, J.M. e AGHAJANIAN, G.K. Noradrenergic neurons of the locus coeruleus: inhibition by epinephrine and activation by the alpha-antagonist piperhexane. **Brain Res**. 112:413-419, 1976.

CHEN, Y.; CHANG, M.; WANG, Z.Z.; CHEN, L.X.; YANG, Q.; QI, Y.M.; WANG, R. [Nphe1]nociceptin(1-13)-NH2 antagonizes nociceptin-induced hypotension, bradycardia, and hindquarters vasodilation in the anesthetized rat. **Can J Physiol Pharmacol**; 80:31-35, 2002.

CHESSICK, C.A.; ALLEN, M.H.; THASE, M.; BATISTA MIRALHA DA CUNHA, A.B.; KAPCZINSKI, F.F.; DE LIMA, M.S.; DOS SANTOS SOUZA, J.J. Azapirones for generalized anxiety disorder. **Cochrane Database Syst Rev**; 3:CD006115, 2006.

CICCOCIOPPPO, R.; ANGELETTI, S.; PANOCCA, I.; MASSI, M. Nociceptin/orphanin FQ and drugs of abuse. **Peptides**; 21:1071-1080, 2000.

CONDE, C. A.; COSTA, V.; TOMAZ, C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. **Pharmacol Biochem Behav**; 63:63-69, 1999.

CONNOR, M.; VAUGHAN, C.W.; JENNINGS, E.A.; ALLEN, R.G.; CHRISTIE, M.J. Nociceptin, Phe(1)psi-nociceptin(1 - 13), nocistatin and prepronociceptin(154-181) effects on calcium channel currents and a potassium current in rat locus coeruleus in vitro. **Br J Pharmacol**; 128:1779-1787, 1999.

CONNOR, M.; VAUGHAN, C.W.; CHIENG, B.; CHRISTIE, M.J.; Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. **Br J Pharmacol**; 119:1614-1618, 1996.

COX, B.M.; BORSODI, A.; CALÓ, G.; CHAVKIN, C.; CHRISTIE, M.J.; CIVELLI, O.; DEVI, L.A.; EVANS, C.; HÖLLT, V.; HENDERSON, G.; KIEFFER, B.; KITCHEN, I.; KREEK, M.J.; LIU-CHEN, L.Y.; MEUNIER, J.C.; PORTOGHESE, P.S.; SHIPPENBERG, T.S.; SIMON, E.J.; TOLL, L.; TRAYNOR, J.R.; UEDA, H.; WONG, Y.H. Opioid receptors, introductory chapter. Modificado pela última vez em 13/10/2010. Disponível em: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=50>. Acessado em: 17/02/2011.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**; 23:238-245, 2002.

DARLAND, T.; HEINRICHER, M.M.; GRANDY, D.K. Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. **Trends Neurosci**; 21:215-221, 1998.

DARWIN, C.A. A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução de Garcia LSL, Companhia das Letras: São Paulo, 2000.

DAVIDSON, J.R. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**; 11:46-50, 2001.

DAUTZENBERG, F.M.; WICHMANN, J.; HIGELIN, J.; PY-LANG, G.; KRATZEISEN, C.; MALHERBE, P.; KILPATRICK, G.J.; JENCK, F. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**; 298:812-819, 2001.

DE ARAUJO, J.E.; HUSTON, J.P.; BRANDAO, M.L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **Eur J Pharmacol**; 432:43-51, 2001.

DEBOER, S.F. e KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **Eur J Pharmacol**; 463:145-161, 2003.

DEAKIN, J.F.W. e GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**; 5:305-315, 1991.

DELL'OSSO, B.; BUOLI, M.; BALDWIN, D.S.; ALTAMURA, A.C. Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**; 25:17-29, 2010.

DEVINE, D.P.; TAYLOR, L.; REINSCHIED, R.K.; MONSMA, F.J.Jr, CIVELLI, O.; AKIL, H. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. **Neurochem Res**; 21:1387-1396, 1996.

DRINGENBERG, H.C.; HARGREAVES, E.L.; BAKER, G.B.; COOLE, R.K.; VANDERWOLF, C.H. p-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion: reduction in exploratory locomotion but no obvious sensory-motor deficits. **Behav Brain Res**; 68:229-237, 1995.

DUARTE, F.S.; TESTOLIN, R.; DE LIMA, T.C. Further evidence on the anxiogenic-like effect of substance P evaluated in the elevated plus-maze in rats. **Behav Brain Res**; 154:501-510, 2004.

ECONOMIDOU, D.; POLICANI, F.; ANGELLOTTI, T.; MASSI, M.; TERADA, T.; CICCOCIOPPPO, R. Effect of novel NOP receptor ligands on food intake in rats. **Peptides**; 27:775-783, 2006

EGAN, T.M.; HENDERSON, G.; NORTH, R.A.; WILLIAMS, J.T. Noradrenaline-mediated synaptic inhibition in rat locus coeruleus neurones. **J Physiol (Lond)**; 345:477-488, 1983.

FERNANDEZ, F.; MISILMERI, M.A.; FELGER, J.C.; DEVINE, D.P. Nociceptin/orphanin FQ increases anxiety-related behavior and circulating levels of corticosterone during neophobic tests of anxiety. **Neuropsychopharmacology**; 29:59-71, 2004.

FLORIN, S.; MEUNIER, J.; COSTENTIN, J. Autoradiographic localization of [3H]nociceptin binding sites in the rat brain. **Brain Res**; 880:11-16, 2000.

FLORIN, S.; SUAUDEAU, C.; MEUNIER, J.C.; COSTENTIN, J. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. **Eur J Pharmacol**; 317:9-13, 1996.

FORNARI, R.V.; SOARES, J.C.; FERREIRA, T.L.; MOREIRA, K.M.; OLIVEIRA, M.G. Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of

contextual and tone fear conditioning in rats. **Behav Neurosci**; 122:98-106, 2008.

FRICCHIONE, G. Generalized anxiety disorder. **N Engl J Med**; 351:675-682, 2004.

FUKUDA, K.; KATO, S.; MORI, K.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; IWABE, N.; MIYATA, T.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. **FEBS Lett**; 343:42-46, 1994.

GARCÍA-LÓPEZ, M.J.; MARTÍNES-MARTOS, J.M.; MAYAS, M.D.; CARRERA, M.P.; RAMÍREZ-EXPÓSITO, M.J. Fisiología de los neuropéptidos. **Rev Neurol**; 35:784-793, 2002.

GARNER, M.; MÖHLER, H.; STEIN, D.J.; MUEGGLER, T.; BALDWIN, D.S. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. **Eur Neuropsychopharmacol**; 19:381-390, 2009.

GASTPAR M. e KLIMM, H.D. Treatment of anxiety, tension and restlessness states with Kava special extract WS 1490 in general practice: a randomized placebo-controlled double-blind multicenter trial. **Phytomedicine**; 10:631-639, 2003.

GAVIOLI, E. C. e CALO', G. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 372:319-330, 2006.

GAVIOLI, E.C.; MARZOLA, G.; GUERRINI, R.; BERTORELLI, R.; ZUCCHINI, S.; DE LIMA, T.C.; RAE, G.A.; SALVADORI, S.; REGOLI, D.; CALO', G. Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signaling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic evidences from the mouse forced swimming test. **Eur J Neurosci**; 17:1987-1990, 2003.

GAVIOLI, E. C.; RAE, G. A.; CALO, G.; GUERRINI, R.; De LIMA, T. C. Central injections of nocistatin or its C-terminal hexapeptide exert anxiogenic-like effect on behaviour of mice in the plus-maze test. **Br J Pharmacol**; 136:764-772, 2002.

GAVIOLI, E.C.; RIZZI, A.; MARZOLA, G.; ZUCCHINI, S.; REGOLI, D.; CALO', G. Altered anxiety-related behavior in nociceptin/orphanin FQ receptor gene knockout mice. **Peptides**; 28:1229-1239, 2007.

GAVIOLI, E.C.; VAUGHAN, C.W.; MARZOLA, G.; GUERRINI, R.; MITCHELL, V.A.; ZUCCHINI, S.; DE LIMA, T.C.; RAE, G.A.;

SALVADORI, S.; REGOLI, D.; CALO', G. Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: New evidence from rats and mice. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**; 369:547-553, 2004.

GEHLERT, D.R.; SHEKHAR, A.; MORIN, S.M.; HIPSKIND, P.A.; ZINK, C.; GACKENHEIMER, S.L.; SHAW, J.; FITZ, S.D.; SAJDYK, T.J. Stress and central Urocortin increase anxiety-like behavior in the social interaction test via the CRF1 receptor. **Eur J Pharmacol**; 509:145-153, 2005.

GIBSON, E.L.; BARNFIELD, A.M.; CURZON, G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT_{2C} receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**; 33:457-465, 1994.

GOELDNER, C.; REISS, D.; KIEFFER, B.L.; OUAGAZZAL, A.M. Endogenous Nociceptin/Orphanin-FQ in the Dorsal Hippocampus Facilitates Despair-Related Behavior. **Hippocampus**; 20:911-916, 2010.

GOELDNER, C.; REISS, D.; WICHMANN, J.; MEZIANE, H.; KIEFFER, B.L.; OUAGAZZAL, A.M. Nociceptin receptor impairs recognition memory via interaction with NMDA receptor-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in the hippocampus. **J Neurosci**; 28:2190-2198, 2008.

GOMES, K.S.; DE CARVALHO-NETTO, E.F.; MONTE, K.C.; ACCO, B.; NOGUEIRA, P.J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. **Brain Res Bull**; 78:323-327, 2009.

GORMAN, J.M. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders; **Depress Anxiety**; 4:160-168, 1996.

GRAEFF, F.G. Bases psicológicas. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. (Ed.). **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 43-52, 1999a.

GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. (Ed.). **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 135-178, 1999b.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**; 163:467-476, 2002.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, Jr.H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**; 23:237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**; 26:67-70, 1993.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. **Pharmacol Biochem Behav**; 53:171-177, 1996.

GRAEFF, F.G. e ZANGROSSI, Jr.H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLNER, P., eds. *Biological Psychiatry*. New York: Wiley, p.879-893, 2002.

GRANT, B.F.; HASIN, D.S.; STINSON, F.S.; DAWSON, D.A.; GOLDSTEIN, R.B.; SMITH, S.; HUANG, B.; SAHA, T.D. The epidemiology of DSM-IV panic disorder and agoraphobia in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **J Clin Psychiatry**; 67:363-374, 2006.

GRANT, B.F.; HASIN, D.S.; STINSON, F.S.; DAWSON, D.A.; RUAN, W.J.; GOLDSTEIN, R.B.; SMITH, S.M.; SAHA, T.D.; HUANG, B. Prevalence, correlates, co-morbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Psychol Med**; 35:1747-1759, 2005.

GRANT, M.M. e WEISS, J.M. Effects of chronic antidepressant drug administration and electroconvulsive shock on locus coeruleus electrophysiologic activity. **Biol Psychiatry**; 49:117-129, 2001.

GRANT, S.J.; HUANG, Y.H.; REDMOND, D.E.JR. Benzodiazepines attenuate single unit activity in the locus coeruleus. **Life Sciences**; 27:2231-2236, 1980.

GRAY, J.A. e MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.

GREEN, M.K.; BARBIERI, E.V.; BROWN, B.D.; CHEN, K.W.; DEVINE, D.P. Roles of the bed nucleus of stria terminalis and of the amygdala in N/OFQ-mediated anxiety and HPA axis activation. **Neuropeptides**; 41:399-410, 2007.

GREEN, M.K. e DEVINE, D.P. Nociceptin/orphanin FQ and NOP receptor gene regulation after acute or repeated social defeat stress. **Neuropeptides**; 43:507-514, 2009.

GREGORY, K.J.; DONG, E.N.; MEILER, J.; JEFFREY CONN, P. Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: Structural insights and therapeutic potential. **Neuropharmacology**; 60:66-81, 2011.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J.; Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. **Brain Res**; 836:221-224, 1999.

GRIEBEL, G.; SIMIAND, J.; SERRADEIL-LE GAL, C.; WAGNON, J.; PASCAL, M.; SCATTON, B.; MAFFRAND, J.P.; SOUBRIE, P. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proc Natl Acad Sci USA**; 99:6370-6375, 2002.

GUERRINI, R.; CALO, G.; RIZZI, A.; BIANCHI, C.; LAZARUS, L.H.; SALVADORI, S.; TEMUSSI, P.A.; REGOLI, D. Address and message sequences for the nociceptin receptor: A structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. **J Med Chem**; 40:1789-1793, 1997.

HADDJERI, N.; LAVOIE, N.; BLIER, P. Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT1A autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology**; 29:1800-1806, 2004.

HALL, M.E.; MILEY, F.; STEWART, J.M. The role of enzymatic processing in the biological actions of substance P. **Peptides**; 10:895-901, 1989.

HARRIS, G.C. e ASTON-JONES, G. Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. **Psychopharmacology (Berl)**; 113:131-136, 1993.

HASHIBA, E.; HIROTA, K.; KUDO, T.; CALO, G.; GUERRINI, R.; MATSUKI, A. Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands on blood pressure, heart rate, and plasma catecholamine concentrations in guinea pigs. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 367:342-347, 2003.

HAWES, B.E.; GRAZIANO, M.P.; LAMBERT, D.G.; Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms. **Peptides**; 21:961-967, 2000.

HAYASHI, E.; KURATANI, K.; KINOSHITA, M.; HARA, H. Pharmacologically distinctive behaviors other than burying marbles during the marble burying test in mice. **Pharmacology**; 86:293-296, 2010.

HIGGINS, G.A.; KEW, J.N.; RICHARDS, J.G.; TAKESHIMA, H.; JENCK, F.; ADAM, G.; WICHMANN, J.; KEMP, J.A.; GROTTICK, A.J. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. **Eur J Neurosci**; 15:911-922, 2002.

HIRAMATSU, M. e INOUE, K. Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory. **Eur J Pharmacol**; 395:149-156, 2000.

HIRAMATSU, M.; MIWA, M.; HASHIMOTO, K.; KAWAI, S.; NOMURA, N. Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamlamine-induced learning and memory impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat. **Brain Research**; 1195:96-103, 2008.

HODGSON, R.A.; HIGGINS, G.A.; GUTHRIE, D.H.; LU, S.X.; POND, A.J.; MULLINS, D.E.; GUZZI, M.F.; PARKER, E.M.; VARTY G.B. Comparison of the V1b antagonist, SSR149415, and the CRF1 antagonist, CP-154,526, in rodent models of anxiety and depression. **Pharmacol Biochem Behav**; 86:431-440, 2007.

HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurol**; 2:463-472, 2003.

HOLMES, A.; HEILIG, M.; RUPNIAK, N. M. J.; STECKLER, T.; GRIEBEL, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends Pharmacol Sci**; 24:580-588, 2003.

HORNUNG, J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **J Chem Neuroanat**; 26:331-343, 2003.

HUGHES, J.; BODEN, P.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.; KELLY, E.; HORWELL, D.C.; HUNTER, J.C.; PINNOCK, R.D.; WOODRUFF, G.N. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. **Proc Natl Acad Sci USA**; 87:6728-6732, 1990.

ITO, H. e YAMANOUCHI, K. Sex and regional differences in decrease of serotonin-immunoreactive cells by parachlorophenylalanine in rat raphe nuclei. **Neurosci Res**. 67:33-39, 2010.

IGWE, O.J.; SUN, X.; LARSON, A.A. Correlation of substance P-induced desensitization with substance P amino terminal metabolites in the mouse spinal cord. **Peptides**; 11:817-825, 1990.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MARTIN, J.R.; KILPATRICK, G.J.; REINSCHIED, R.K.; MONSMA, F.J.Jr.; NOTACKER, H.P.; CIVELLI, O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. **Proc Natl Acad Sci USA**; 94:14854-14858, 1997.

JENCK, F.; WICHMANN, J.; DAUTZENBERG, F.M.; MOREAU, J.L.; OUAGAZZAL, A.M.; MARTIN, J.R.; LUNDSTROM, K.; CESURA, A.M.; POLI, S.M.; ROEVER, S.; KOLCZEWSKI, S.; ADAM, G.; KILPATRICK, G. A synthetic agonist at the orphanin FQ/Nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**; 97:4938-4943, 2000.

KAMEI, J.; MATSUNAWA, Y.; MIYATA, S.; TANAKA, S.; SAITOH, A. Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. **Eur J Pharmacol**; 489:77-87, 2004.

KAPUSTA, D.R. e KENIGS, V.A. Cardiovascular and renal responses produced by central orphanin FQ/nociceptin occur independent of renal nerves. **Am J Physiol**; 277:987-995, 1999.

KAPUSTA, D.R.; SEZEN, S.F.; CHANG, J.; LIPPTON, H.; KENIGS, V.A. Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). **Life Sci**; 60:15-21, 1997.

KARLSSON, R.M.; HOLMES, A.; HEILIG, M.; CRAWLEY, J.N. Anxiolytic-like actions of centrally-administered neuropeptide Y, but not galanin, in C57BL/6J mice. **Pharmacol Biochem Behav**; 80:427-436, 2005.

KASK, A.; RAGO, L.; HARRO, J. Anxiogenic-like effect of the NPY Y1 receptor antagonist BIBP3226 administered into the dorsal periaqueductal gray matter in rats. **Regul Pept**; 75-76:255-262, 1998.

KAWAHARA, Y.; HESSELINK, M.B.; VAN SCHARRENBURG, G.; WESTERINK, B. Tonic inhibition by orphanin FQ/nociceptin of noradrenaline neurotransmission in the amygdale. **Eur J Pharmacol**; 485:197-200, 2004.

KENT, J.M.; COPLAN, J.D.; GORMAN, J.M. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. **Biol Psychiatry**; 44:812-824, 1998.

KINRYS, G. e WYGANT, L.E. Transtornos de ansiedade em mulheres: gênero influencia o tratamento? **Rev Bras Psiquiatr**; 27:42-50, 2005.

KNOLL, A.T.; MELONI, E.G.; THOMAS, J.B.; CARROLL, F.I.; CARLEZON, W.A.JR. Anxiolytic-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats. **J Pharmacol Exp Ther**; 323:838-845, 2007.

KORF, J.; BUNNEY, B.S.; AGHAJANIAN, G.K. Noradrenergic neurons: morphine inhibition of spontaneous activity. **Eur J Pharmacol**; 25:165-169, 1974.

KORNSTEIN, S.G.; RUSSELL, J.M.; SPANN, M.E.; CRITS-CHRISTOPH, P.; BALL, S.G. Duloxetine in the treatment of generalized anxiety disorder. **Expert Rev Neurother**; 9:155-65, 2009.

KORNUM, B.R.; LICHT, C.L.; WEIKOP, P.; KNUDSEN, G.M.; AZNAR, S. Central serotonin depletion affects rat brain areas differently: a qualitative and quantitative comparison between different treatment schemes. **Neurosci Lett**; 392:129-134, 2006.

KÖSTER, A.; MONTKOWSKI, A.; SCHULZ, S.; STÜBE, E.M.; KNAUDT, K.; JENCK, F.; MOREAU, J.L.; NOTHACKER, H.P.; CIVELLI, O.; REINSCHIED, R.K. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 96:10444-10449, 1999.

KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H.J.; SHANBHOGUE, R.; MUNONYEDI, U.S. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. **Behav Neural Biol**; 54:234-253, 1990.

KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. **Phytother Res**; 20:1023-1035, 2006.

KUZMIN, A.; SANDIN, J.; TERENIUS, L.; OGREN, S.O. Evidence in locomotion test for the functional heterogeneity of ORL-1 receptors. **Br J Pharmacol**; 141:132-140, 2004.

LAMBERT, D.G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**; 7:694-710, 2008.

LE MAÎTRE, E.; VILPOUX, C.; COSTENTIN, J.; LEROUX-NICOLLET, I. Opioid receptor-like 1 (NOP) receptors in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for localization on serotonergic neurons and functional adaptation after 5,7-dihydroxytryptamine lesion. **J Neurosci Res**; 81:488-496, 2005.

LEDoux, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**; 23:155-184, 2000.

LEGGETT, J.D.; HARBUZ, M.S.; JESSOP, D.S.; FULFORD, A.J. The nociceptin receptor antagonist [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin/ orphanin FQ-NH2 blocks the stimulatory effects of nociceptin/orphanin FQ on the HPA axis in rats. **Neuroscience**; 141:2051-2057, 2006.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. **J Anxiety Disord**; 25:554-562, 2011.

LUAN, Y. e XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. **Curr Med Chem**; 14:639-647, 2007.

MABROUK, O.S.; MARTI, M.; MORARI, M. Endogenous nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) contributes to haloperidol-induced changes of nigral amino acid transmission and parkinsonism: a combined microdialysis and behavioral study in naïve and nociceptin/orphanin FQ receptor knockout mice. **Neuroscience**. 166:40-48, 2010.

MCCONALOGUE, K. e BUNNETT, N.W. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. II. Regulation of neuropeptide receptors in enteric neurons. **Am J Physiol**; 274:792-796, 1998.

MCDERMOTT, C. e KELLY, J.P. Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly utilised albino rat strains. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 32:1816-1823, 2008.

MCDONALD, J.; BARNES, T.A.; OKAWA, H.; WILLIAMS, J.; CALO', G.; ROWBOTHAM, D.J.; LAMBERT, D.G. Partial agonist behaviour depends upon the level of nociceptin/orphanin FQ receptor expression: studies using the ecdysone-inducible mammalian expression system. **Br J Pharmacol**; 140:61-70, 2003.

MAHMOUD, S.; MARGAS, W.; TRAPPELLA, C.; CALÓ, G.; RUIZ-VELASCO, V.; Modulation of silent and constitutively active nociceptin/orphanin FQ receptors by potent receptor antagonists and Na⁺ ions in rat sympathetic neurons; **Mol Pharmacol**; 77:804-817, 2010.

MAMIYA, T.; NODA, Y.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; NABESHIMA, T. Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. **Brain Res**; 783:236-240, 1998.

MANABE, T.; NODA, Y.; MAMIYA, T.; KATAGIRI, H.; HOUTANI, T.; NISHI, M.; NODA, T.; TAKAHASHI, T.; SUGIMOTO, T.; NABESHIMA, T.; TAKESHIMA, H. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. **Nature**; 394: 577-581, 1998.

MANSOUR, A.; HOVERSTEN, M.T.; TAYLOR, L.P.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. **Brain Res**; 700:89-98, 1995.

MARTI, M.; MELA, F.; FANTIN, M.; ZUCCHINI, S.; BROWN, J.M.; WITTA, J.; DI, BENEDETTO, M.; BUZAS, B.; REINSCHIED, R.K.; SALVADORI, S.; GUERRINI, R.; ROMUALDI, P.; CANDELETTI, S.; SIMONATO, M.; COX, B.M.; MORARI, M. Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease. **J Neurosci**; 95:9591-9601, 2005.

MARTI, M.; MELA, F.; GUERRINI, R.; CALÒ, G.; BIANCHI, C.; MORARI, M. Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission in rat substantia nigra reverses haloperidol-induced akinesia and normalizes nigral glutamate release. **J Neurochem**; 91:1501-1504, 2004a.

MARTI, M.; MELA, F.; VERONESI, C.; GUERRINI, R.; SALVADORI, S.; FEDERICI, M.; MERCURI, N.B.; RIZZI, A.; FRANCHI, G.; BEANI, L.; BIANCHI, C.; MORARI, M. Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signalling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior. **J Neurosci**; 24:6659-6666, 2004b.

MARTI, M.; STOCCHI, S.; PAGANINI, F.; MELA, F.; DE RISI, C.; CALO, G.; GUERRINI, R.; BARNES, T.A.; LAMBERT, D.G.; BEANI, L.; BIANCHI, C.; MORARI, M. Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex. **Br J Pharmacol**; 138:91-98, 2003.

MARTI, M.; VIARO, R.; GUERRINI, R.; FRANCHI, G.; MORARI, M. Nociceptin/Orphanin FQ modulates motor behavior and primary motor cortex output through receptors located in substantia nigra reticulata. **Neuropsychopharmacology**; 34:341-355, 2009.

MEUNIER, J.C.; MOLLEREAU, C.; TOLL, L.; SUAUDEAU, C.; MOISAND, C.; ALVINERIE P.; BUTOUR, J.L.; GUILLEMOT, J.C.; FERRARA, P.; MONSARRAT, B.; MARZARGUIL. H.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. **Nature**; 377:532-535, 1995.

MILLAN, M.J.; BROCCO, M.; GOBERT, A.; DOREY, G.; CASARA, P.; DEKEYNE, A. Anxiolytic properties of the selective, non-peptidergic CRF(1) antagonists, CP154,526 and DMP695: a comparison to other classes of anxiolytic agent. **Neuropsychopharmacology**; 25:585-600, 2001.

MIWA, M.; UCHIDA, S.; HORIBA, F.; TAKESHIMA, H.; NABESHIMA, T.; HIRAMATSU, M. Nociceptin and its metabolite attenuate U0126-induced memory impairment through a nociceptin opioid peptide (NOP) receptor-independent mechanism. **Neurobiol Learn Mem**; 93:396-405, 2010.

MLINAR, B.; TATINI, F.; BALLINI, C.; NENCIONI, S.; DELLA CORTE, L.; CORRADETTI, R. Differential autoinhibition of 5-hydroxytryptamine neurons by 5-hydroxytryptamine in the dorsal raphe nucleus. **Neuroreport**; 16:1351-1355, 2005.

MOLLEREAU, C. e MOULEDOUS, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. **Peptides**; 21:907-917, 2000.

MOLLEREAU, C.; SIMONS, M.J.; SOULARUE, P.; LINERS, F.; VASSART, G.; MEUNIER, J.C.; PARMENTIER, M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. **Proc Natl Acad Sci USA**; 93:8666-8670, 1996.

MONTGOMERY, S.A. e JUDGE, R. Treatment of depression with associated anxiety: comparisons of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. **Acta Psychiatr Scand**; 101(Suppl. 403):9-16, 2000.

MONTIEL, J.L.; CORNILLE, F.; ROQUES, B.P.; NOBLE, F. Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. **J Neurochem**; 68:354-361, 1997.

MURPHY, N.P.; LEE, Y.; MAIDMENT, N.T. Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. **Brain Res**; 832:168-170, 1999.

MUSTAZZA, C. e BASTANZIO, G. Development of nociceptin receptor (NOP) agonists and antagonists. **Med Res Rev**; 2010. *Epub ahead of print*.

NAZZARO, C.; BARBIERI, M.; VARANI, K.; BEANI, L.; VALENTINO, R.J.; SINISCALCHI, A. Swim stress enhances nociceptin/orphanin FQ-induced inhibition of rat dorsal raphe nucleus activity in vivo and in vitro: role of corticotropin releasing factor. **Neuropharmacology**; 58:457-464, 2010.

NAZZARO, C.; RIZZI, A.; SALVADORI, S.; GUERRINI, R.; REGOLI, D.; ZEILHOFER, H.U.; CALO, G. UFP-101 antagonizes the spinal antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ: behavioral and electrophysiological studies in mice. **Peptides**; 28:663-669, 2007.

NEAL, C.R.Jr.; MANSOUR, A.; REINSCHIED, R.; NOTHACKER, H. P.; CIVELLI, O.; WATSON, S.J.Jr.; Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. **J Comp Neurol**; 406:503-547, 1999.

NICOLAS, L.B.; KOLB, Y.; PRINSEN, E.P.M. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **Eur J Pharmacol**; 547:106-115, 2006.

NISHI, M.; HOUTANI, T.; NODA, Y.; MAMIYA, T.; SATO, K.; DOI, T.; KUNO, J.; TAKESHIMA, H.; NUKADA, T.; NABESHIMA, T.; YAMASHITA, T.; NODA, T.; SUGIMOTO, T. Unrestrained nociceptive

response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. **EMBO J**; 16:1858-1864, 1997.

NJUNG'E, K. e HANDLEY, S.L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**; 38:63-67, 1991.

NOBLE, F. e ROQUES, B.P. Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. **FEBS Lett**; 401:227-229.

NODA, Y.; MAMIYA, T.; MANABE, T.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; NABESHIMA, T. Role of nociceptin systems in learning and memory. **Peptides**; 21:1063-1069, 2000.

NUSBAUM, M.P.; BLITZ, D.M.; SWENSEN, A.M.; WOOD, D.; MARDER, E. The roles of co-transmission in neural network modulation; **TRENDS Neurosci**; 24:146-154, 2001.

OKADA, K.; SUJAKU, T.; CHUMAN, Y.; NAKASHIMA, R.; NOSE, T.; COSTA, T.; YAMADA, Y.; YOKOYAMA, M.; NAGAHISA, A.; SHIMOHIGASHI, Y. Highly potent nociceptin analog containing the Arg-Lys triple repeat. **Biochem Biophys Res Commun**; 278:493-498, 2000.

OKAWA, H.; KUDO, M.; KUDO, T.; GUERRINI, R.; LAMBERT, D. G.; KUSHIKATA, T.; YOSHIDA H.; MATSUKI, A. Effects of nociceptinNH₂ and [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ on rat brain noradrenaline release in vivo and in vitro. **Neurosci Lett**; 303:173-176, 2001.

OKUDA-ASHITAKA, E. e ITO, S.; Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. **Peptides**; 21:1101-1109, 2000.

OKUYAMA, S.; CHAKI, S.; KAWASHIMA, N.; SUZUKI, Y.; OGAWA, S.; NAKAZATO, A.; KUMAGAI, T.; OKUBO, T.; TOMISAWA, K. Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. **J Pharmacol Exp Ther**; 289:926-35, 1999.

PAXINOS, G. e WATSON, C.; **The rat brain** – in stereotaxic coordinates. 2 ed. Australia: Academic Press, 1986.

PELUSO, J.; LAFORGE, K. S.; MATTHES H. W.; KREEK, M. J.; KIEFFER, B. L.; GAVERIAUX-RUFF, C. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. **J Neuroimmunol**; 81:184-192, 1998.

PEZZONE, M.A.; LEE, W.S.; HOFFMAN, G.E.; PEZZONE, K.M.; RABIN, B.S. Activation of brainstem catecholaminergic neurons by conditioned and unconditioned aversive stimuli as revealed by c-Fos immunoreactivity. **Brain Res**; 608:310-318, 1993.

PINHEIRO, S.H.; ZANGROSSI, Jr.H., DEL-BEM, C.M.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **An Acad Bras Cienc**; 79:71-85, 2007.

POBBE, R.L. e ZANGROSSI, H.JR. 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Psychopharmacology (Berl)**; 183:314-321, 2005.

POLIDORI, C.; DE CARO, G.; MASSI, M. The hyperphagic effect of nociceptin/ orphanin FQ in rats. **Peptides**; 21:1051-1062, 2000.

POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI, Jr.H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**; 147:185-192, 2003.

PRUT, L. e BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**; 463(1-3):3-33, 2003.

RATAUD, J.; DARCHE, F.; PIOT, O.; STUTZMANN, J.M.; BOHME, G.A.; BLANCHARD, J.C. Anxiolytic effect of CCK-antagonists on plus-maze behavior in mice. **Brain Res**; 548:315-317, 1991.

REDMOND, D.E.Jr.; HUANG Y.H.; SNYDER, D.R.; MAAS, J.W. Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. **Brain Res**; 116:502-510, 1976.

REDROBE, J.P.; CALO', G.; GUERRINI, R.; REGOLI, D.; QUIRION, R. [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. **Br J Pharmacol**; 131:1379-1384, 2000.

REINSCHIED, R.K.; NOTHACKER, H.P.; BOURSON, A.; ARDATI, A.; HENNINGSSEN, R.A.; BUNZOW, J.R.; GRANDY, D.K.; LANGEN, H.; MONSMA, F.J.Jr, CIVELLI, O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. **Science**; 270:792-794, 1995.

RIZZI, A.; BIGONI, R.; MARZOLA, G.; GUERRINI, R.; SALVADORI, S.; REGOLI, D.; CALO', G. Characterization of the locomotor activity-inhibiting

effect of nociceptin/orphanin FQ in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 363:161-165, 2001.

RIZZI, A.; MOLINARI, S.; MARTI, M.; MARZOLA, G.; CALO', G. Nociceptin/orphanin FQ receptor knockout rats: In vitro and in vivo studies. **Neuropharmacology**; 2011. *In Press*.

RIZZI, A.; NAZZARO, C.; MARZOLA, G.G.; ZUCCHINI, S.; TRAPELLA, C.; GUERRINI, R.; ZEILHOFER, H.U.; REGOLI, D.; CALO', G. Endogenous nociceptin/orphanin FQ signalling produces opposite spinal antinociceptive and supraspinal pronociceptive effects in the mouse formalin test: pharmacological and genetic evidences. **Pain**; 124:100-108, 2006.

ROOZENDAAL, B.; LENGVILAS, R.; MCGAUGH, J.L.; CIVELLI, O.; REINSCHIED, R.K. Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. **Learn Mem**; 14:29-35, 2007.

ROQUES, B.P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. **Pharmacol Rev**; 45:87-146, 1993.
ROTZINGER, S.; LOVEJOY, D.A.; TAN, L.A. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety; **Peptides**; 31:736-756, 2010.

SAKURADA, C.; SAKURADA, S.; ORITO, T.; TAN-NO, K.; SAKURADA, T. Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by endopeptidase-24.11: an in vitro and in vivo study. **Biochem Pharmacol**; 64:1293-1303, 2002.

SANDIN, J.; GEORGIEVA, J.; SCHOTT, P.A.; OGREN, S.O.; TERENIUS, L. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. **Eur J Neurosci**; 9:194-197, 1997.

SANDIN, J.; GEORGIEVA, J.; SILBERRING, J.; TERENIUS, L. In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus. **Neuroreport**; 10:71-6, 1999.

SCHLICKER, E.; WERTHWEIN, S.; KATHMANN, M.; BAUER, U. Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL1 receptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 358:418-422, 1998.

SCHOLL, J.L.; RENNER, K.J.; FORSTER, G.L.; TEJANI-BUTT, S. Central monoamine levels differ between rat strains used in studies of depressive behavior. **Brain Res**; 1355:41-51, 2010.

SENA, L.M.; BUENO, C.; POBBE, R.L.; ANDRADE, T.G.; ZANGROSSI, H.JR.; VIANA, M.B. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behav Brain Res**; 142:125-133, 2003.

SHIMAZAKI, T.; IJIMA, M.; CHAKI, S. The pituitary mediates the anxiolytic-like effects of the vasopressin V1B receptor antagonist, SSR149415, in a social interaction test in rats. **Eur J Pharmacol**; 543:63-67, 2006.

SINGH, L.; LEWIS, A.S.; FIELD, M.J.; HUGHES, J.; WOODRUFF, G.N. Evidence for an involvement of the brain cholecystokinin B receptor in anxiety. **Proc Natl Acad Sci USA**; 88:1130-1133, 1991.

SINISCALCHI, A.; RODI, D.; MORARI, M.; MARTI, M.; CAVALLINI, S.; MARINO, S.; BEANI, L.; BIANCHI, C. Direct and indirect inhibition by nociceptin/orphanin FQ on noradrenaline release from rodent cerebral cortex in vitro. **Br J Pharmacol**; 136:1178-1184, 2002.

SORENSEN, G.; LINDBERG, C.; WORTWEIN, G.; BOLWIG, T.G.; WOLDBYE D.P. Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation. **J Neurosci Res**; 77:723-729, 2004.

STANFORD, S.C. Central noradrenergic neurons and stress. **Pharmac Ther**; 68:291-342, 1995.

TAO, R.; MA, Z.; THAKKAR, M.M.; MCCARLEY, R.W.; AUERBACH, S.B. Nociceptin/orphanin FQ decreases serotonin efflux in the rat brain but in contrast to a kappa-opioid has no antagonistic effect on mu-opioid-induced increases in serotonin efflux. **Neuroscience**; 147:106-116, 2007.

TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; EMOTO, H.; ISHII, H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. **Eur J Pharmacol**; 405:397-406, 2000.

TEIXEIRA, R.M.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO, S.J.; CALIXTO, J.B.; ERA, G.A.; DE LIMA, T.C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur J Pharmacol**; 311:7-14, 1996.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety; **Pharmacol Biochem Behav**; 65:571-576, 2000.

TEJADA, S.; RIAL, R.V.; GAMUNDÍ, A.; ESTEBAN, S. Effects of serotonergic drugs on locomotor activity and vigilance states in ring doves. **Behav Brain Res**; 216:238-246, 2011.

THOMAS, A.; BURANT, A.; BUI, N.; GRAHAM, D.; YUVA-PAYLOR, L.A.; PAYLOR, R. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**; 204:361-373, 2009.

TEJANI-BUTT, S.; KLUCZYNSKI, J.; PARÉ, W.P. Strain-dependent modification of behavior following antidepressant treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 27:7-14, 2003.

TREIT, D.; ROBINSON, A.; ROTZINGER, S.; PESOLD, C. Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test. **Behav Brain Res**; 54:23-34, 1993.

UCHIYAMA, H.; TODA, A.; HIRANITA, T.; WATANABE, S.; EYANAGI, R. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic-like effect of nociceptin/orphanin FQ in rats. **Neurosci Lett**; 431:66-70, 2008.

UHLENHUTH, E.H.; BALTER, M.B.; BAN, T.A.; YANG, K. Trends in recommendations for the pharmacotherapy of anxiety disorders by an international expert panel, 1992-1997. **Eur Neuropsychopharmacol**; 9:393-398, 1999.

VARTY, G.B.; COHEN-WILLIAMS, M.E.; MORGAN, C.A.; PYLAK, U.; DUFFY, R.A.; LACHOWICZ, J.E.; CAREY, G.J.; COFFIN, V.L. The gerbil elevated plus-maze II: anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. **Neuropsychopharmacology**; 27:371-379, 2002.

VARTY, G.B.; HYDE, L.A.; HODGSON, R.A.; LU, S.X.; MCCOOL, M.F.; AZDOBA, T.M.; DEL VECCHIO, R.A.; GUTHRIE, D.H.; POND, A.J.; GRZELAK, M.E.; XU, X.; KORFMACHER, W.A.; TULSHIAN, D.; PARKER, E.M.; HIGGINS, G.A. Characterization of the nociceptin receptor (ORL-1) agonist, Ro64-6198, in tests of anxiety across multiple species. **Psychopharmacology**; 182:132-143, 2005.

VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G.; LÖSCHMANN, P.A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. **Pharmacol Biochem Behav**; 58:167-172, 1997.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**; 49:549-554, 1994.

VILPOUX, C.; NAUDON, L.; COSTENTIN, J.; LEROUX-NICOLLET, I. Chronic paroxetine increases [3H]nociceptin binding in rat dorsal raphe nucleus. **Neuroreport**; 13:111-114, 2002.

VITALE, G.; ARLETTI, R.; RUGGIERI, V.; CIFANI, C.; MASSI, M. Anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ in the elevated plus maze and in the conditioned defensive burying test in rats. **Peptides**; 27:2193-2200, 2006.

VITALE, G.; RUGGIERI, V.; FILAFERRO, M.; FRIGERI, C.; ALBONI, S.; TASCEDDA, F.; BRUNELLO, N.; GUERRINI, R.; CIFANI, C.; MASSI, M. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe 1, Arg 14, Lys 15]N/OFQ-NH₂ (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. **Psychopharmacology (Berl)**; 207:173-189, 2009.

WANG, X.; ZHANG, L.; YANG, K.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; FANG, H.; XU, W. The effect of different species aminopeptidase N structure on the activity screening of aminopeptidase N inhibitor. **Biol Pharm Bull**; 33:1658-1665, 2010.

WEST, C.H.K.; RITCHIE, J.C.; BOSS-WILLIAMS, K.A.; WEISS, J.M. Antidepressant drugs with differing pharmacological actions decrease activity of locus coeruleus neurons. **Int J Neuropsychopharmacol**; 12:627-641, 2009.

WHITING, P.J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? **DDT**; 8:445-450, 2003.

WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. **Science**; 177:180-183, 1972.

WITTA, J.; PALKOVITS, M.; ROSENBERGER, J.; COX, B.M. Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. **Brain Res**; 997:24-29, 2004.

WITTCHEN, H.-U. e JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe – a critical review and appraisal of 27 studies. **Eur Neuropsychopharmacol**; 15:357-376, 2005.

WITTMANN, W.; SCHUNK, E.; ROSSKOTHEN, I.; GABURRO, S.; SINGEWALD, N.; HERZOG, H.; SCHWARZER, C. Prodynorphin-derived

peptides are critical modulators of anxiety and regulate neurochemistry and corticosterone. **Neuropsychopharmacology**; 34:775-785, 2009.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; KIMURA, S. Analgesic effect of intrathecally administered nociceptin, an opioid receptor-like1 receptor agonist, in the rat formalin test. **Neuroscience**; 81:249-54, 1997.

YU, J.; CHAIT, B.T.; TOLL, L.; Kreek, M.J. Nociceptin in vitro biotransformation in human blood. **Peptides**; 17:873-876, 1996.

ZANGROSSI, H. e GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**; 44:1-5, 1997.

ZANGROSSI JR.H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**; 25:637-645, 2001.

ZOAR, J. e WESTENBERG. H.G.M. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. **Acta Psychiatr Scand**; 10:39-49, 2000.

ZHU, C.B.; CAO, X.D.; XU, S.F.; WU, G.C. Orphanin FQ potentiates formalin-induced pain behavior and antagonizes morphine analgesia in rats. **Neurosci Lett**; 235:37-40, 1997.

8. APÊNDICE

Apêndice I

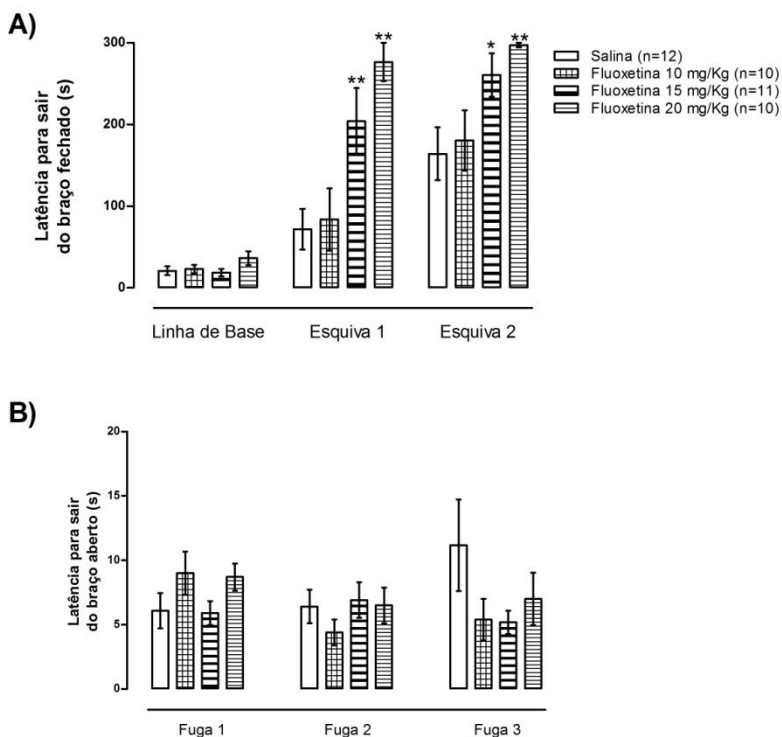


Figura I – Efeito do tratamento intraperitoneal agudo de Fluoxetina (10, 15 e 20,0 mg/Kg) nas latências para sair dos braços fechado (A) e aberto (B) do labirinto em T elevado. Dados representados como média \pm S.E.M. As latências para sair do braço fechado (Linha de Base, Esquiva 1-2) e de um dos braços abertos (Fuga 1-3) do labirinto em T elevado foram medidas seqüencialmente em intervalos de 30 s, começando 30 min após o tratamento. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram expostos a um dos braços abertos por 30 min. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. Salina (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan).

Tabela I – Número de cruzamentos e comportamentos de levantar avaliados no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M..

Drogas (mg/Kg)	Número		
	N	Cruzamentos	Levantar
Salina	12	71,17 \pm 6,60	14,08 \pm 1,65
Fluoxetina (10)	10	74,30 \pm 7,98	10,90 \pm 1,92
Fluoxetina (15)	11	59,09 \pm 8,84	10,09 \pm 2,59
Fluoxetina (20)	10	68,00 \pm 8,41	10,20 \pm 2,53

Os animais, imediatamente após saírem do labirinto em T elevado, foram avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. ANOVA de medidas repetidas.

Apêndice II

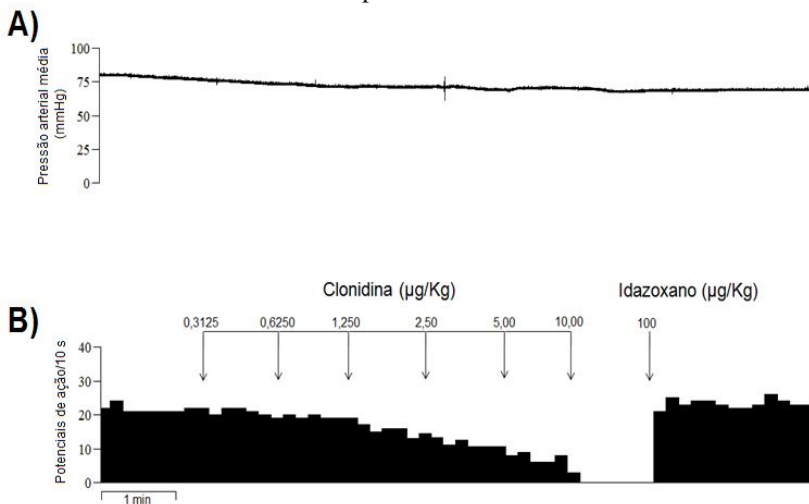


Figura II – Efeito da administração endovenosa de Clonidina (0,3125 – 10,00 $\mu\text{g/Kg}$) na pressão arterial (A) e na taxa de disparo dos neurônios do locus cerúleo (B) *in vivo*. A administração endovenosa de Idazoxano (100 $\mu\text{g/Kg}$) bloqueia o efeito da Clonidina.

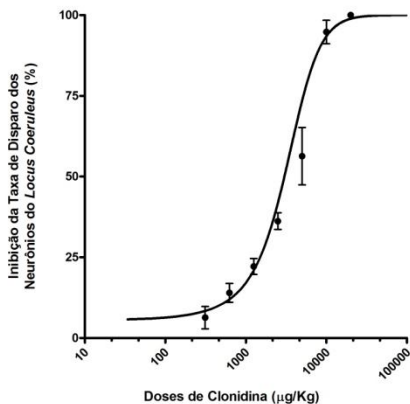


Figura III – Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório da administração endovenosa de Clonidina (0,3125 – 10,00 $\mu\text{g/Kg}$) na taxa de disparo dos neurônios locus cerúleo. O símbolo (•) representa a média \pm E.P.M. da porcentagem de diminuição da taxa de disparo em relação à frequência basal. A linha é uma curva teórica construída por regressão não-linear (para mais detalhes ver item 3.8). Note que o eixo horizontal está em escala logarítmica. $\text{EC}_{50} = 4,9 \mu\text{g/Kg}$. $N = 6$.

Apêndice III

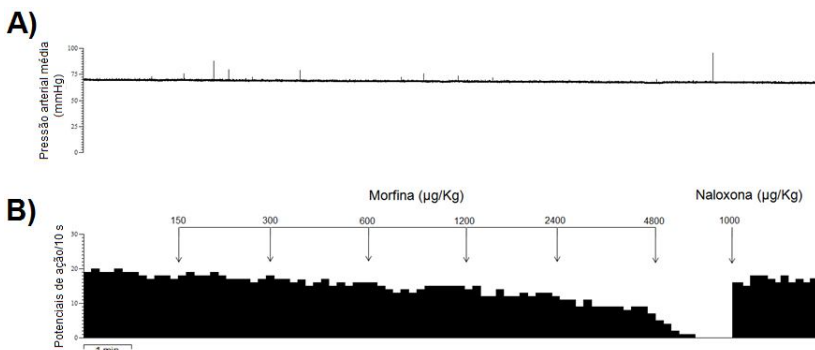


Figura IV – Efeito da administração endovenosa de Morfina (150 - 4800 µg/Kg) na pressão arterial (A) e na taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo (B) *in vivo*. A administração endovenosa de Naloxona (1000 µg/Kg) bloqueia o efeito da Morfina.

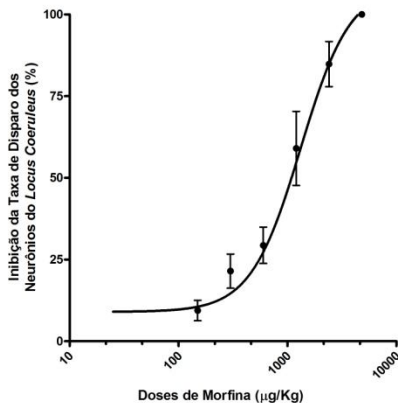


Figura V – Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório da administração endovenosa de Morfina (150 – 4800 µg/Kg) na taxa de disparo dos neurônios do loco cerúleo. O símbolo (•) representa a média \pm E.P.M. da porcentagem de diminuição da taxa de disparo em relação à freqüência basal. A linha é uma curva teórica construída por regressão não-linear (para mais detalhes ver item 3.8). Note que o eixo horizontal está em escala logarítmica. $EC_{50} = 1317,5$ µg/Kg. $N = 7$.

Apêndice IV

Tabela II – Efeitos da administração de N/OFQ (agonista do receptor NOP) e de UFP-101 (antagonista peptídico competitivo do receptor NOP) em diferentes locais do sistema nervoso central e em diferentes testes de ansiedade em roedores.

Droga	Local de Injeção	Espécie Animal	Teste Comportamental (dose em nmol)	Efeito	Referências
N/OFQ	V.L.	C (MORO)	Caixa claro-escuro (0,3 e 1)	-	Jenck et al., 1997.
	V.L.	C (MORO)	Conflito operante (3)	-	Jenck et al., 1997.
	V.L.	R (Wistar)	LCE (0,03, 0,1 e 0,3)	-	Jenck et al., 1997.
	V.L.	C (Swiss)	LCE (0,01)	-	Gavioli et al., 2002.
	V.L.	C (ICR)	Placa perfurada (0,01)	-	Kamei et al., 2004.
	V.L.	R (Long-Evans)	CA (0,01, 0,1 e 1)	+	Fernandez et al., 2004.
	V.L.	R (Long-Evans)	LCE (1)	+	Fernandez et al., 2004.
	V.L.	R (Long-Evans)	Caixa claro-escuro (0,1 e 1)	+	Fernandez et al., 2004.
	V.L.	R (Long-Evans)	CA (0,01, 0,1 e 1)	+	Green et al., 2007.
	Amígdala	R (Long-Evans)	CA (0,1 e 1)	+	Green et al., 2007.
	BNST	R (Long-Evans)	CA (1)	+	Green et al., 2007.
UFP-101	V.L.	C (ICR)	Placa perfurada (5)	+	Kamei et al., 2004.
	V.L.	R (Wistar)	LCE (10)	0	Vitale et al., 2006.
			Esconder defensivo	0	Vitale et al., 2006.
			condicionado (10)		
	H.D.	C (C57BL/6N)	Caixa claro-escuro (1 e 3)	0	Goeldner et al., 2010.

Abreviações: 0 = sem efeito; - = efeito do tipo ansiolítico; + = efeito do tipo ansiogênico; BNST = núcleo do leito da estria terminal, do inglês *bed nucleus of stria terminalis*; C = camundongo; CA = campo aberto; H.D. = hipocampo dorsal; LCE = labirinto em cruz elevado; R = rato; V.L. = ventrículo lateral.